

Title	ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行に関する研究(Dissertation_全文)
Author(s)	坂井, 伸光
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2011-03-23
URL	http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k16068
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	author

ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行に関する研究

2011 年

坂 井 伸 光

目 次

第1章 序 論	1
1.1 大気中に存在する粒子状物質	1
1.2 ナノ粒子とナノテクノロジー	2
1.2.1 ナノ粒子とは	2
1.2.2 ナノテクノロジーと今後の市場予測	3
1.3 ナノ粒子の生態影響	4
1.3.1 はじめに	4
1.3.2 ナノ粒子の体内動態	5
1.3.2.1 ナノ粒子の肺胞への沈着と滞留	5
1.3.2.2 ナノ粒子の組織内への侵入および移行	6
1.3.3 ナノ粒子の毒性	7
1.3.3.1 カーボンナノチューブの毒性	7
1.3.3.2 二酸化チタンナノ粒子の毒性	8
1.3.3.3 シリカナノ粒子の毒性	10
1.3.3.4 金属ナノ粒子の毒性	11
1.3.3.5 ディーゼル排気粒子の毒性	12
1.3.3.6 ナノ粒子の物理化学的特性と毒性との関連性	13
1.3.4 ナノ粒子のリスク評価に関する動向	15
1.4 ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行	17
1.4.1 細胞内への物質の取り込み	17
1.4.2 物質の神経細胞内輸送	17
1.4.3 放射性金属トレーサー曝露による嗅神経を介した中枢神経系への移行	18
1.4.4 ナノ粒子曝露による嗅神経を介した中枢神経系への移行	19
1.5 本研究の目的	20
参考文献	21
第2章 ナノ粒子の血流を介した中枢神経系への移行	29
2.1 背景	29
2.2 二酸化チタンナノ粒子の気管内投与による体内動態	29
2.2.1 はじめに	29
2.2.2 実験方法	31
2.2.2.1 二酸化チタンナノ粒子のラット気管内投与とチタン重量濃度の定量	31
2.2.2.2 走査型電子顕微鏡を用いた二酸化チタンナノ粒子の観察	32
2.2.3 結果	32

2.2.4 考察	34
2.3 放射性シリカ粒子の尾静脈投与による体内動態	35
2.3.1 はじめに	35
2.3.2 実験方法	36
2.3.2.1 ^{14}C -ADP-SiO ₂ 粒子の調整	36
2.3.2.2 ^{14}C -ADP-SiO ₂ 粒子のマウス尾静脈投与と放射能測定試料の作成	38
2.3.2.3 放射能の測定および組織中粒子重量濃度の算出	38
2.3.2.4 ^{14}C -ADP-SiO ₂ 粒子のマウス尾静脈投与による排泄実験	39
2.3.3 結果	40
2.3.4 考察	45
2.4 結論	49
参考文献	50
 第3章 ナノ粒子の嗅神経を介した嗅球への移行経路	55
3.1 背景	55
3.2 嗅覚器の神経回路	55
3.3 蛍光ポリスチレンナノ粒子を点鼻投与したラットにおけるナノ粒子の観察	59
3.3.1 はじめに	59
3.3.2 実験方法	61
3.3.3 結果	62
3.3.4 考察	67
3.4 金コロイドを点鼻投与したマウスの嗅球におけるナノ粒子の観察	68
3.4.1 はじめに	68
3.4.2 実験方法	70
3.4.3 結果	70
3.4.4 考察	73
3.5 結論	74
参考文献	75
 第4章 ディーゼル排気粒子曝露後の嗅神経イメージング	77
4.1 背景	77
4.2 ディーゼル排気粒子の物理化学的特性	78
4.3 エンジンオイルおよび DEP の組成分析	79
4.3.1 はじめに	79
4.3.2 実験方法	79
4.3.2.1 DEP のサンプリング	79

4.3.2.2	エンジンオイルの湿式分解.....	80
4.4.2.3	DEP の湿式分解.....	81
4.4.2.4	ICP-MS を用いた定量分析.....	81
4.3.3	結果.....	82
4.3.3.1	エンジンオイルに含まれる金属元素.....	82
4.3.3.2	DEP に付着した金属元素.....	82
4.3.4	考察.....	83
4.4	DEP を吸入曝露したマウスの嗅粘膜および嗅球のイメージング.....	84
4.4.1	はじめに.....	84
4.4.2	実験方法.....	84
4.4.2.1	マウスへの DEP 吸入曝露.....	84
4.4.2.2	切片の作成.....	85
4.4.2.3	免疫染色.....	85
4.4.2.4	SR-XRF を用いた元素マッピング.....	86
4.4.2.5	画像処理.....	87
4.4.2.6	クリューバー・バレー染色.....	87
4.4.3	結果.....	88
4.4.3.1	SR-XRF による DEP の組成分析.....	88
4.4.3.2	嗅粘膜における元素マッピング.....	89
4.4.3.3	嗅球における元素マッピング.....	89
4.4.4	考察.....	92
4.5	DEP を点鼻投与したマウスの嗅粘膜および嗅球のイメージング.....	96
4.5.1	はじめに.....	96
4.5.2	実験方法.....	97
4.5.2.1	投与試料の作成.....	97
4.5.2.2	DEP 懸濁液の点鼻投与と切片の作成.....	97
4.5.2.3	SR-XRF を用いた元素マッピング.....	98
4.5.2.4	XAFS 分析.....	98
4.5.2.5	画像処理.....	98
4.5.2.6	免疫染色とクリューバー・バレー染色.....	99
4.5.3	結果.....	99
4.5.3.1	SR-XRF による DEP 懸濁液の組成分析.....	99
4.5.3.2	嗅粘膜における元素マッピング.....	100
4.5.3.3	嗅球における元素マッピング.....	103
4.5.3.4	XAFS 分析.....	107
4.5.4	考察.....	111

4.6 結論	113
参考文献	114
第5章 ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行.....	117
5.1 背景	117
5.2 放射性シリカナノ粒子を点鼻投与したマウスにおけるナノ粒子の体内動態	117
5.2.1 はじめに	117
5.2.2 実験方法	118
5.2.2.1 ^{14}C -ADP-SiO ₂ ナノ粒子の調整	118
5.2.2.2 ^{14}C -ADP-SiO ₂ ナノ粒子の点鼻投与と放射能の測定	118
5.2.3 結果	119
5.2.4 考察	121
5.3 PC12 細胞を用いたナノ粒子の神経細胞内への侵入	122
5.3.1 はじめに	122
5.3.2 実験方法	122
5.3.2.1 細胞培養.....	122
5.3.2.2 投与試料の調整.....	122
5.3.2.3 培養液中でのナノ粒子の粒度分布	123
5.3.2.4 ナノ粒子の細胞内侵入量の定量.....	124
5.3.2.5 ナノ粒子の細胞毒性試験.....	125
5.3.3 結果	125
5.3.3.1 ナノ粒子の培養液中の粒度分布	125
5.3.3.2 ナノ粒子の PC12 細胞内侵入量.....	127
5.3.3.3 蛍光ポリマー粒子および量子ドットの細胞毒性	131
5.3.4 考察	131
5.4 結論	135
参考文献	135
第6章 結 論	139

謝 辞

第1章 序 論

1.1 大気中に存在する粒子状物質

大気中に存在する汚染物質の1つに、粒子状物質がある。粒子状物質とは、燃焼によるばいじん、黄砂のような土壌の飛散、海塩などから生じる固体や液体の粒の総称である。1960年代の高度経済成長を契機に、大気中の粒子状物質が急激に増加し、深刻な大気汚染問題となっている。大気中に存在する粒子状物質の内、粒径が $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下の粒子は浮遊性粒子状物質（Suspended Particle Matter：SPM）と定義される。SPMの健康影響に関する研究は古くから行われており、1972年には我が国のSPM濃度の環境基準を時間値の1日平均値が 0.10 mg/m^3 以下、かつ1時間値が 0.20 mg/m^3 以下と定めている。近年では、環境省により $2.5\text{ }\mu\text{m}$ 以下のSPMの曝露量と呼吸器症状等の健康影響との因果関係について調査を進めている。

SPMには、発生源から直接大気中に放出されたもの（1次粒子）と、硫黄酸化物（ SO_x ）、窒素酸化物（ NO_x ）等のガス状物質が大気中で粒子状物質に変化したもの（2次粒子）がある。1次粒子の発生源には、工場等から排出されるばいじんや、ディーゼル車の排出ガスに含まれる粒子状物質等の人為的由来のものと、土壌由来の粒子や海塩粒子等の自然由来のものがある。大都市部では人為的由来の粒子が圧倒的に多い。さらに、人為的発生源粒子の80%以上が粒径 $2.5\text{ }\mu\text{m}$ 以下の微小粒子（ $\text{PM}_{2.5}$ ）である。微小粒子は金属成分、イオン成分、炭素成分、芳香族炭化水素など非常に多くの物質を含み、健康への影響も危惧されている。一方、農村部では自然的発生源粒子が多く、粒径が $2.5\text{ }\mu\text{m}$ から $10\text{ }\mu\text{m}$ の粗大粒子（ PM_{10} ）の割合が大きくなる。粗大粒子は主に土壌由来の粒子や海塩粒子であるため、健康影響は少ないと考えられている。

都市部における粒子状物質の発生源は、自動車からの排出が多い。2005年度の東京都内の粒子状物質排出量は年間3920 tと推計されている。この内、自動車からの排出は全体の28%、タイヤやブレーキの摩耗による排出は17%を占めている。これら自動車からの粒子状物質の排出は、大部分がディーゼル車である。また、東京都内の自動車排気ガスに由来する窒素酸化物の45%が自動車から排出されており、特にディーゼル車からは36%が排出されている¹。これらの事実から、都市部における大気汚染の原因の1つとして、ディーゼルエンジンによる排気ガスが大きく寄与していると言える。

粒子状物質の粒子数、表面積、重量濃度のピークは粒径により大きく変化する²。重量濃度では粒径 $0.3\text{ }\mu\text{m}$ と $5\text{ }\mu\text{m}$ をピークとする二峰型であるが、個数濃度では粒径 10 nm 、表面積では粒径 100 nm をピークとする単峰型となる。ここでピークが現れた微小粒子の多くは、ディーゼル排気粒子によるものと考えられている。

1.2 ナノ粒子とナノテクノロジー

1.2.1 ナノ粒子とは

国際標準化機構（ISO）が2008年に発表した技術仕様書「ISO/TS 27687」では、ナノスケールの物質に関する用語が定義された³。これによると、ナノ粒子は縦、横、高さのいずれの次元ともナノスケール（1～100 nm）の粒子であると定義される。また、縦、横、高さの内いずれかの次元がナノスケールである物質はナノ物質と定義され、ナノ粒子はナノ物質の一つに含まれる。その形状により6種類のナノ物質が定義されており、ナノ粒子の他にナノファイバー、ナノプレート、ナノワイヤー、ナノチューブ、ナノロッドが定義されている。

ナノ粒子の大きさを生物や生体物質と比較すると、ナノ粒子はアリ（約1 cm）やミジンコ（約1 mm）、赤血球（約8 μm ）よりも小さく、DNA（約1 nm）やタンパク質（約10 nm）、ウイルス（約100 nm）と同じ大きさとなる（図1-1）。その特性はバルク体の同じ物質とは大きく異なり、反応性や溶解性、電磁気的特性、光学的特性、機械的特性など特異的な性質を有する。さらに、フラーレンやカーボンナノチューブのように特定の形状や構造を有することで、新たな特性を持った材料が生み出される⁴。こうした特徴から、優れた新素材としてナノ粒子は大きな可能性を持っており、近年急速な発展を遂げているナノテクノロジーに大きく貢献している。

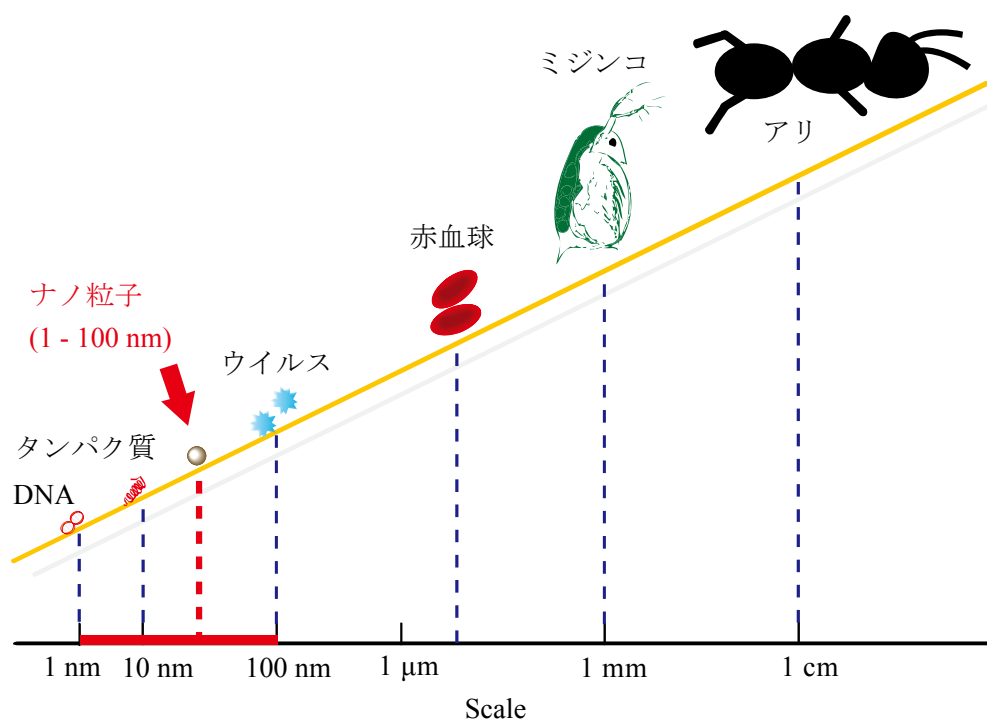


図 1-1 ナノ粒子と生物および生体物質との大きさの比較

1.2.2 ナノテクノロジーと今後の市場予測

ナノテクノロジーとは、1.2.1 で示したようなナノサイズ特有の物質特性を利用し、新しい機能や優れた性能を持つ製品（ナノテク製品）を開発する技術のことである。この技術を生かし、様々な産業分野への応用が期待されている。情報通信関係では、高密度・高効率なメモリやコンピュータ素子の開発、カーボンナノチューブを利用した高輝度ディスプレイ、フォトニック結晶を用いた高速光ネットワークデバイス等への応用が検討されている。医療関係では、ドラッグデリバリーシステムの開発が急速に進んでいる。また、スポーツ用品や化粧品、衣類などのコンシューマー製品にもナノテクノロジーが利用されており、我々がナノテク製品を使用する機会は次第に増加している。

ナノテクノロジー市場は今後、飛躍的に拡大すると見込まれている。2004 年では 9000 億円であった我が国のナノテクノロジー市場規模は、2010 年には 6 兆円市場、2015 年には 23 兆円市場になるとも予測されている（図 1-2）⁵。日本だけでなく、海外でもナノテクノロジーは多大な注目を集めている。米国では、国家ナノテクノロジー戦略（NNI）と呼ばれる国家的規模のプロジェクトを 2000 年より開始した。欧州では、2005 年に「ナノサイエンスとナノテクノロジーに関する欧州行動計画 2005～2009 年」を発表し、ナノテクノロジー分野への投資を増大した。またアジアでも、ナノテクノロジーの予算が年々増加しており、ナノテクノロジーの開発は世界各地で進んでいる。

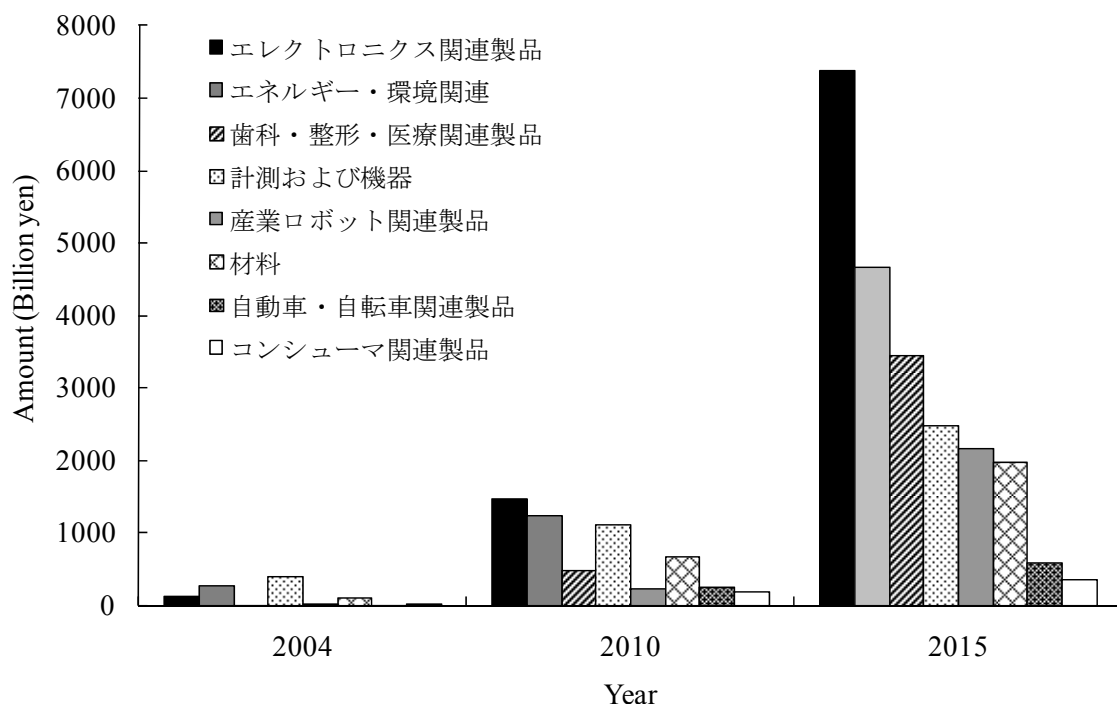


図 1-2 ナノテクノロジーの市場予測⁵（一部改編）

1.3 ナノ粒子の生体影響

1.3.1 はじめに

ナノテクノロジーが飛躍的に発展するに伴い、人工産物のナノ粒子が大気中に劇的に増加している。一般大気中のナノ粒子の重量は微小粒子に比べて極めて小さく、 $0.5\sim 2\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ である⁶。しかし、同一重量当たりの粒子数や粒子表面積は、微小粒子と比べて飛躍的に増大する（表 1-1）。したがって、粒子の小ささに加えてその粒子数や粒子表面積、さらにはナノ粒子特有の物理化学的特性が生体に影響を与える可能性が懸念されている。

ナノ粒子の生体影響として最も懸念されている問題は、生体の防御機構がナノ粒子には機能せず、体内で滞留もしくは組織内に侵入することである。大気中から吸入された粒子状物質は線毛運動などのクリアランス作用により体外へ排泄されるが、ナノ粒子の場合、この作用が機能せず肺胞まで到達すると言われている。さらに、ナノ粒子は生体のあらゆる組織内に侵入することが報告されており、吸入したナノ粒子は体中に移行することが懸念されている。実際、生体内に侵入したナノ粒子が毒性を示した報告は多数存在しており、上記で示したようなナノ粒子の特異的な動態がその毒性と関連していることが考えられる。

過去には、建材に使用されていたアスベストが肺の線維化（アスベスト肺）を引き起こした事例があった。この事例での最大の問題は、アスベストの生体影響を十分に調査する前にその優れた特性を利用して建材への使用を展開したため、後に健康被害が顕在化した時には既に手遅れであったことである。ナノ粒子に関しても同様に、その生体影響は未だ解明されていないにもかかわらず、ナノテクノロジー市場は飛躍的に拡大している。こうした背景から、ナノ粒子の生体影響は一刻も早く解明すべき課題である。

本節では、ナノ粒子の生体影響に関する過去の報告をまとめた。ナノ粒子の生体影響の懸念要素である体内動態と、ナノ粒子曝露によってもたらされる毒性についてそれぞれ記載した。ナノ粒子の毒性に関しては、本研究で使用した二酸化チタンナノ粒子、シリカナノ粒子、ディーゼル排気粒子の毒性に関する報告を中心に記した。また、ナノ粒子のリスク評価に向けた世界の動向についてまとめた。

表 1-1 大気中 $10\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ 当たりの粒子数および粒子表面積⁶

粒径 (nm)	粒子数 (cm^3)	粒子表面積 ($\mu\text{m}^2/\text{cm}^3$)
5	1.5×10^8	1.2×10^4
20	2.4×10^6	3.0×10^3
250	1.2×10^3	240
5000	0.15	12

1.3.2 ナノ粒子の体内動態

1.3.2.1 ナノ粒子の肺胞への沈着と滞留

1994年、国際放射線防護委員会（ICRP）は粒子の呼吸器への沈着率を数理モデルで発表した（図 1-3）⁷。このモデルによると、粒径が $1\text{ }\mu\text{m}$ 以上の粒子はほとんどが鼻腔内に沈着し、気管支や肺胞まではほとんど到達しない。一方、粒径が 100 nm よりも小さい粒子は鼻腔ではほとんど沈着せず、気管支を通過して肺胞まで到達する。その沈着率は約 20 nm でピークとなり、曝露量の50%を超える。すなわち、呼吸器内に侵入したナノ粒子は鼻腔や気管支でトラップされにくく、肺胞まで到達すると考えられる。

呼吸器系へ沈着した粒子は、呼吸器系の自浄作用により体外へ排出される。鼻腔では、粘膜線毛輸送や鼻汁により排出される。気管支では、線毛運動により咽頭まで運ばれて嚥下されるか、咳によって体外へ排出される。また、肺胞まで到達した粒子は、肺胞マクロファージによって貪食され、加水分解酵素により分解される。したがって、これらの自浄作用を受けなかった粒子は、肺胞内で滞留することになる。

Oberdorsterらは、ナノ粒子およびマイクロ粒子の肺への滞留に関する既存の研究をまとめ、粒径によって肺に滞留する粒子の割合が変わることを明らかにした⁸。図 1-4 は、粒径の異なる粒子（粒径 $15\text{ nm}\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ ）を曝露したラットにおける、曝露 24 時間後に肺を洗浄して気管支肺胞洗浄液に存在した粒子と、肺に滞留した粒子の割合である。粒径が $0.5\text{ }\mu\text{m}$ よりも大きい粒子は、肺に曝露した粒子の

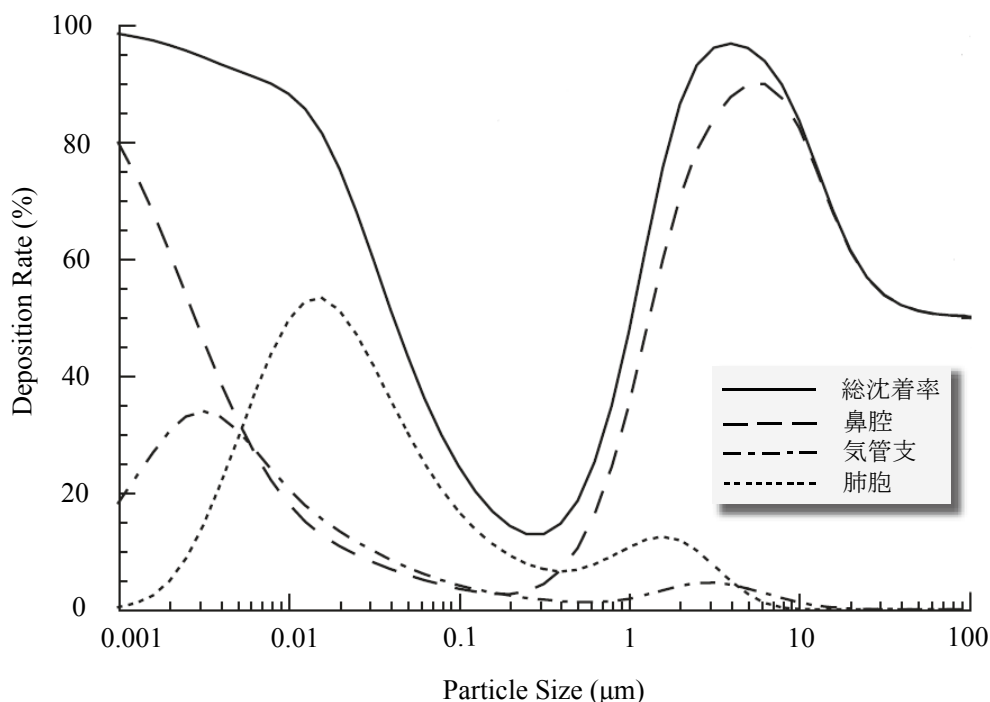


図 1-3 ナノ粒子の呼吸器への沈着率⁷（一部改編）

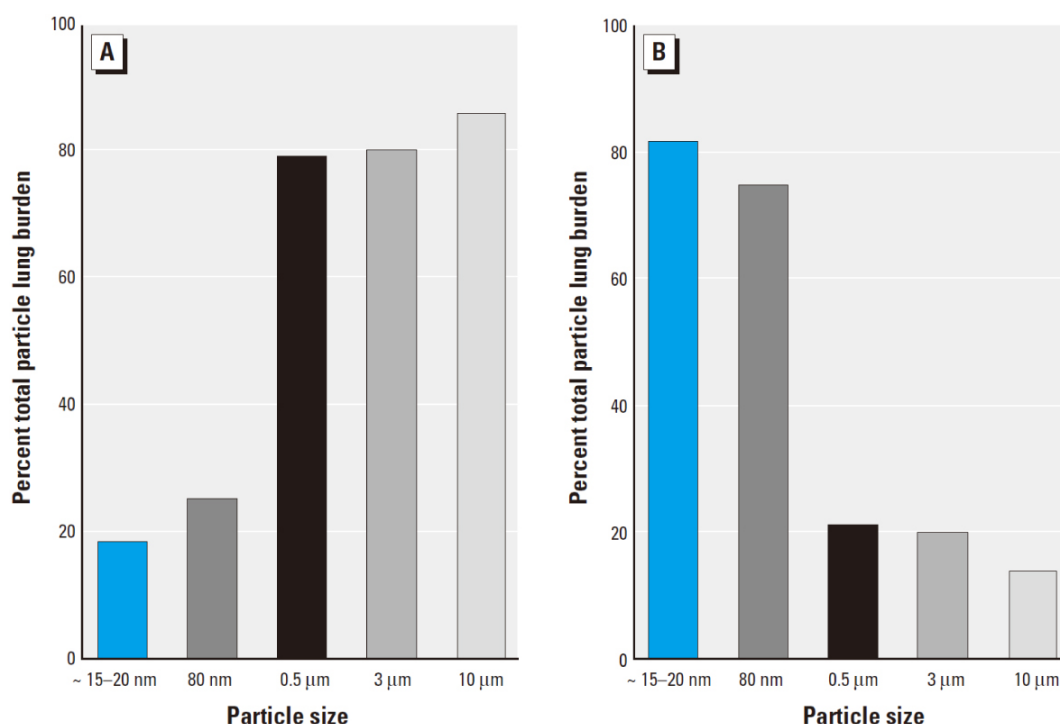


図 1-4 粒径の異なる粒子（粒径 15 nm～10 μm）を曝露したラットにおける曝露 24 時間後に肺を洗浄して気管支肺胞洗浄液中に存在した粒子（A）と肺に滞留した粒子（B）の百分率⁸

内、その 8～9 割は肺胞マクロファージの貪食作用等によりクリアランスを受けて気管支肺胞洗浄液中に存在した。一方、粒径が 15～80 nm の粒子は肺を洗浄しても 2 割程度しか気管支肺胞洗浄液中に存在せず、肺に滞留した。したがって、肺に侵入したナノ粒子は呼吸器系の自浄作用を回避し、肺内で滞留もしくは肺の組織内に侵入することが示唆された。

1.3.2.2 ナノ粒子の組織内への侵入および移行

肺胞まで到達したナノ粒子は、肺胞マクロファージの貪食作用を回避して肺胞上皮に沈着し、肺胞上皮細胞に取り込まれて肺胞上皮内に侵入することが報告されている。Geiserらは、粒径 22 nm の二酸化チタンナノ粒子をラットに吸入曝露した。その結果、吸入した粒子の内、79% は気道の内腔と肺胞に、11% は毛細血管内に、4.8% は結合組織に、4.6% は肺胞上皮細胞と内皮細胞に存在した⁹。Stearnsらは、二酸化チタンナノ粒子（粒径 50 nm）の懸濁液をヒト II 型肺胞上皮細胞（A549）に曝露した。その結果、エンドサイトーシスにより粒子が A549 細胞内に取り込まれた様子が観察された¹⁰。

肺胞上皮内に侵入したナノ粒子は血管内やリンパ管内に侵入することが報告されている。Nemmarらは、テクネシウムで標識した炭素ナノ粒子（粒径 < 100 nm）

をヒトに吸入曝露した。その結果、曝露から1分後には血液中で放射能が確認された。また、肝臓や尿、唾液腺等でも放射能が確認された¹¹。Ferlinらは、二酸化チタン粒子（粒径20 nm, 250 nm）をラットに吸入曝露した。その結果、20 nm粒子曝露群は250 nm粒子曝露群に比べ、リンパへの移行量が曝露終了直後では18.6倍、29週間後では11.7倍、52週間後では2.9倍多いことが示された¹²。またChoiらは、蛍光ナノ粒子（粒径5 nm, 9 nm, 27 nm）を肺へ注入したところ、曝露から30分後には肺からリンパ節の移行が観察された¹³。これらの報告は、肺に侵入したナノ粒子が肺の組織内に侵入し、血管内やリンパ管内に侵入して体中へ移行することを示唆している。

ナノ粒子の肺から他臓器への移行も多数報告されている。Kreylingらは、イリジウムナノ粒子（粒径15 nm, 80 nm）を、ラットに吸入曝露した。その結果、両粒子曝露群ともに肝臓、脾臓、心臓および脳へ粒子が移行した。また、15 nm粒子曝露群の方が80 nm粒子曝露群よりも肝臓への移行量が多かった¹⁴。Oberdorsterらは、¹³Cナノ粒子（粒径22 nm, 30 nm）をラットに吸入曝露したところ、22 nm粒子曝露群、30 nm粒子曝露群ともに、肝臓へ¹³Cナノ粒子が移行した¹⁵。Takenakらは、銀ナノ粒子（粒径15 nm）をラットに吸入曝露した。その結果、腎臓、心臓、嗅脳、リンパ節へ銀ナノ粒子が移行した¹⁶。またSemmlerらは、¹⁹²Irナノ粒子（粒径15～20 nm）をラットに吸入曝露し、曝露から3日後～6ヶ月後に肺、肝臓、脾臓、脳、腎臓を摘出した。その結果、肝臓、脾臓、脳、腎臓中で曝露から7日後に放射能が最大値を示した。その後は減少し、2ヶ月後にはほぼゼロに近い値となったものの、肝臓、脾臓では6ヶ月後もわずかに粒子が存在した¹⁷。

さらに、ナノ粒子が皮膚内に侵入する可能性についても議論されている。日焼け止め剤に使用される二酸化チタンナノ粒子（粒径20, 100 nm）の皮膚曝露では、皮膚の深層へは侵入しなかった¹⁸。英国王立協会・王立工学アカデミーの報告書でも、ナノ粒子の皮膚内への侵入は起こりにくいと報告している¹⁹。しかし、ナノ粒子の皮膚内への侵入に関する報告はこれまであまり為されておらず、その安全性は未だ確立されていない。また、皮膚が損傷を受けている場合は、その動態が変化する可能性がある。

1.3.3 ナノ粒子の毒性

1.3.3.1 カーボンナノチューブの毒性

カーボンナノチューブとは、直径が0.4～50 nm、長さが数μm～数mmの円筒の形をした炭素の結晶である。その化学構造は、グラファイト層を丸めてつなぎ合わせたものである。カーボンナノチューブを初めとするナノカーボンは、従来の材料では到達し得ない電気伝導性、熱伝導性および機械的強度を有している。これらの特性により、化学的、電気的および機械的分野への応用が進んでおり、ナノテクノロジーの中核となる基盤材料として期待されている。カーボンナノチ

チューブは、一層のグラファイト層が巻かれている単層カーボンナノチューブと、同心円状に多層的に巻かれている多層カーボンナノチューブの2種類に分かれる。単層、多層とも優れた特性を有するが、特に単層は高導電性、柔軟性、異方性、低次元性等の機能を有するため、大量生産技術の開発が急速に進んでいる。

一方で、両カーボンナノチューブともにその毒性に関する文献が多数報告されている。Warheitらは、単層カーボンナノチューブ（直径 1.4 nm，長さ 1 μm ）をマウスに気管内投与した。その結果、曝露から 24 時間後に肺胞洗浄液（BAL）中の多形核白血球（PMN）数、乳酸脱水素酵素（LDH）値が増加した。また、曝露から 1 週間後には、単層カーボンナノチューブを取り囲むように肉芽腫が形成された²⁰。Shvedovaらは、単層カーボンナノチューブ（直径 1~4 nm，長さ~5 μm ）、カーボンナノ粒子（粒径 14 nm）およびシリカ粒子（粒径 2.1 μm ）を、マウスの咽頭に投与した。その結果、単層カーボンナノチューブ投与群のマウスで肺胞の炎症、BAL中の総細胞数、PMN数、蛋白数が最も大きくなった²¹。その他の報告でも、単層カーボンナノチューブ曝露によりミトコンドリアDNAの損傷²²、用量依存性の間質性肉芽腫が発現している²³。

多層カーボンナノチューブも同様に、その毒性を示した文献が多数報告されている。図 1-5 は、多層カーボンナノチューブ（直径<50 nm，長さ 450 μm ）を気管内投与したマウスにおける、投与直後および投与から 7 日後の肺切片の光学顕微鏡像である。投与直後の肺では、多層カーボンナノチューブの凝集体が細気管支壁に付着している様子が観察された。また投与から 7 日後の肺では、細気管支壁が破壊されて単核細胞の炎症を誘発し、細胞の過形成が観察された²⁴。Nemmarらは、15 層の多層カーボンナノチューブ（直径 10 nm，長さ<10 μm ）をラットに気管内投与した。その結果、投与から 24 時間後にPMN数が増加した²⁵。Satoらは、長さが異なる 2 種類の多層カーボンナノチューブ（直径 20~40 nm，長さ 220 nmと 825 nm）をラットの皮下組織に埋め込んだ。その結果、225 nm粒子曝露群ではリソソーム内でカーボンナノチューブが確認されたが、825 nm粒子曝露群では細胞質に存在していた。また、炎症反応は 825 nm粒子曝露群の方が大きく、長さによって炎症反応や組織内の挙動が変わることが示唆された²⁶。

1.3.3.2 二酸化チタンナノ粒子の毒性

二酸化チタンは化学的に安定で無害とされており、これまで幅広い用途で使用されてきた。現在では、光触媒の原料として二酸化チタンが使われており、急速に普及が進んでいる。高層ビルの外壁、家屋の屋根、車のボディ、室内の内壁、高速道路の遮音壁などには、既に光触媒が使用されている。また、靴下、バスタオル、消臭剤、日焼け止めクリームなど、我々の身の回りの製品でも光触媒を使った製品を見かけるようになった。近年、その触媒作用を高めるために、原料である二酸化チタンをナノ粒子化した製品が開発されている。ナノサイズまで二酸

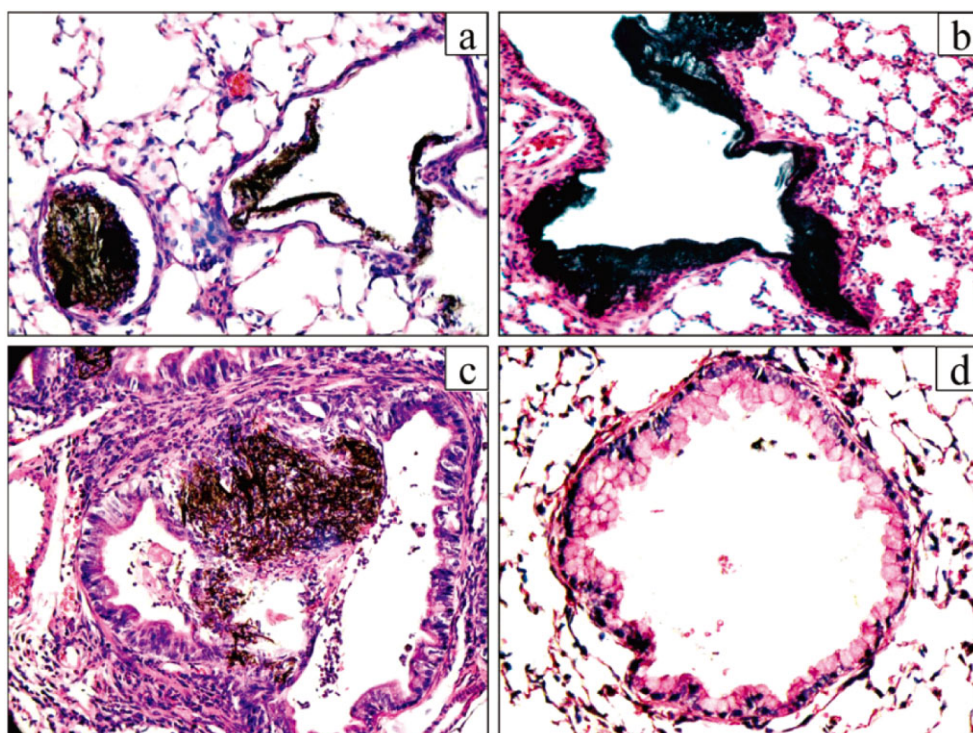


図 1-5 多層カーボンナノチューブを気管内投与したマウスにおける曝露直後の肺切片 (a, b), および曝露 7 日後の肺切片 (c, d) の光学顕微鏡像²⁴
(a) 細気管支で観察された多層カーボンナノチューブの凝集体,
(b) 細気管支壁への付着, (c) 細気管支壁の破壊と単核細胞の炎症,
(d) 細胞の過形成

化チタンを小さくすることにより, 表面積が飛躍的に増大し, 触媒反応が高まるためである。

一方, 二酸化チタンナノ粒子を曝露した場合, 毒性が確認された報告が存在する。Renwickらは, 二酸化チタン粒子 (粒径 29 nm, 250 nm) をラットに気管内投与した。その結果, 29 nm粒子投与群では肺胞洗浄液中のLDH値, γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 値, 蛋白量が増加し, 肺の炎症を誘発した。一方, 250 nm粒子投与群では対照群との有意な差は見られなかった²⁷。Chenらは, 二酸化チタンナノ粒子 (粒径 19~21 nm) をマウスに気管内投与した。その結果, 用量依存的に平均肺胞径, 気道面積, 中隔弦張が増加したほか, マクロファージの蓄積やアポトーシスを確認した²⁸。またReevesらは, 二酸化チタンナノ粒子 (粒径 5 nm) を金魚の皮膚細胞 (GFSk-S1) に曝露したところ, 二酸化チタンナノ粒子のみの曝露では細胞の生存率に変化が見られなかったものの, UVA照射下の曝露では生存率が顕著に低下した。またDNA損傷も, 二酸化チタンナノ粒子とUVAの両方を曝露した方が大きかった²⁹。二酸化チタンに紫外線を照射すると, OHラジカルが発生することは一般的に知られている。これらの報告から, 二酸化チタンナノ粒

子が毒性を示したほか、紫外線照射によりその毒性が増大することが明らかとなった。

二酸化チタンナノ粒子の皮膚曝露による皮膚内への侵入に関しても報告がある。Schultzらは、粒径や形状、表面修飾の異なる二酸化チタンナノ粒子（T 805：粒径 20 nm，立方体，疎水性，Eusolex T-2000：粒径 100 nm，針状，両親媒性，Tioveil AQ：粒径 100 nm，針状，親水性）が含まれた3種類の日焼け止めクリームを皮膚曝露した。その結果、角質層の表層では粒子が確認されたが、角質層の内部や表皮、真皮へは侵入が認められなかった³⁰。同様にMenzelらは、針状の二酸化チタンナノ粒子（長さ 45～150 nm，幅 17～35 nm）を皮膚曝露したところ、角質層への侵入は認められたものの、有棘層への侵入は認められなかった³¹。このように、二酸化チタンナノ粒子が皮膚の深部まで侵入する可能性は低いと考えられるが、日焼けやアトピーなどで皮膚が障害を受けている場合、ナノ粒子が皮膚の損傷部分より皮膚の深部まで侵入する可能性がある。

1.3.3.3 シリカナノ粒子の毒性

シリカ粒子は古くから化粧品の原料として、ファンデーション、クリーム、乳液、歯磨等に使用されてきた。近年では、工業用に乾式シリカナノ粒子（粒径 7～22 nm）が生産され、樹脂の補強、塗料などの増粘、半導体ウェーハの研磨といったさまざまな製品・用途に使われている。2006年の乾式シリカナノ粒子の国内使用量は約 13500 トンで、シリコーンゴム、FRP、塗料等に使用された³²。強度の向上および絶縁性・耐水性の向上が利用のメリットとされている。

このように、シリカは日常的に使用されているものの、古くから職業性肺疾患として知られる珪肺に代表されるように、シリカ曝露による健康影響は昔から知られている。近年では、シリカナノ粒子の生産量の拡大に伴い、その毒性を検討した報告も少なくない。Jinらは、蛍光シリカナノ粒子（粒径 50 nm）をヒト肺胞上皮細胞（A549）に曝露した。その結果、重量濃度が 0.01 mg/mL以下の曝露群では生存率の低下は認められなかったものの、0.1 mg/mL以上の曝露群では生存率の低下が見られた。また、曝露から 72 時間後には細胞内への顕著な侵入が確認され、細胞内に侵入した粒子は細胞核の外側に局在していた³³。Fujiwaraらは、粒径の異なるシリカナノ粒子（粒径 5 nm，26 nm，78 nm）を藻類に曝露したところ、小さい粒径ほど強い毒性を示した³⁴。またChoらは、アモルファスのシリカナノ粒子（粒径 14 nm）をマウスに気管内投与した。その結果、サイトカイン（IL-1 β ，IL-6，IL-8，TNF- α ）やケモカイン（MCP-1，MIP-2）が増加し、慢性肉芽腫性炎症を引き起こした³⁵。

一方、シリカナノ粒子よりもサブミクロンサイズやミクロンサイズのシリカ粒子の方が毒性を示した報告もある。Warheitらは、平均粒径が 12 nm，50 nm，300 nm，534 nmの4種類のシリカ粒子をラットに気管内投与した。その結果、12 nm粒子

投与群＝534 nm粒子投与群＞300 nm粒子投与群＞50 nm粒子投与群の順に高い細胞毒性や肺組織の変性を示した³⁶。Choらは、シリカ粒子（粒径 50 nm, 100 nm, 200 nm）をマウスに尾静脈投与したところ、100 nm粒子投与群および 200 nm粒子投与群で投与から 12 時間後に肝臓で有意な炎症反応が認められたが、50 nm粒子投与群では有意な差は認められなかった³⁷。またChenらは、シリカナノ粒子（粒径 10 nm）とミクロンサイズのシリカ粒子（粒径 0.5～10 μm ）をラットに気管内投与した。その結果、ミクロンサイズのシリカ粒子の方が、珪肺結節が顕著に現れた。また、サイトカイン（IL-4, TGF- β 1）量も、ミクロンサイズのシリカ粒子の方が大きかった³⁸。このように、シリカナノ粒子の毒性は粒径だけに依存するのではなく、結晶型や形状などその他の因子も関連していることが考えられる。

1.3.3.4 金属ナノ粒子の毒性

金属ナノ粒子は、その大きさに依存した特殊な触媒特性、光学特性、電子特性、磁気特性などの量子サイズ効果を示すといわれている。この特性を生かすため、単分散の金属ナノ粒子の調製に関する研究が行われている。

金属粒子の毒性は溶接を行った作業者が数時間後に発熱を起こす金属ヒューム熱に代表されるように、古くから知られている。近年では、金属ナノ粒子の毒性に関する文献が多数報告されている。Chenaらは、銅粒子（粒径 24 nm, 17 μm ）をマウスに経口投与した。その結果、17 μm 粒子投与群の半数致死量（LD₅₀）が 5000 mg/kg以上であったのに対し、24 nm粒子投与群では 413 mg/kgであった。また、24 nm投与群では、腎臓中に形態学的な変性が確認された³⁹。Sayesらは、酸化亜鉛粒子（粒径 313 nm）をラットに気管内投与した。その結果、投与から 1 日後に用量依存的にBAL中の細胞数, LDH値, PMN数が増加した⁴⁰。Yamamotoらは、二酸化チタン粒子（粒径 130 nm）、酸化アルミニウム粒子（粒径 590 nm）、二酸化ジルコニウム粒子（粒径 530 nm）、窒化ケイ素粒子（粒径 700 nm）および炭化ケイ素粒子（粒径 180 nm）をマウス・マクロファージ細胞株（J774A.1）に曝露した。その結果、二酸化ジルコニウム粒子＞酸化アルミニウム粒子＞窒化ケイ素粒子＞二酸化チタン粒子＞炭化ケイ素粒子の順に毒性が強かった⁴¹。Hussainらも同様に、粒径の異なる種々の金属粒子を曝露し、金属種および粒径の違いによる毒性の変化を検討した。銀ナノ粒子（粒径 15 nm, 100 nm）、三酸化モリブデン粒子（粒径 30 nm, 150 nm）、アルミニウム粒子（粒径 30 nm, 103 nm）、四酸化三鉄ナノ粒子（粒径 30 nm, 47 nm）、二酸化チタンナノ粒子（粒径 40 nm）、酸化マンガン粒子（粒径 1～2 μm ）、タングステン粒子（粒径 27 μm ）および酸化カドミウム粒子（粒径 1000 nm）をラットの肝細胞（BRL 3A）に 24 時間曝露した。図 1-6 は、各粒子曝露による MTT アッセイの結果である。酸化カドミウム粒子、銀ナノ粒子は他の粒子と比べて低濃度で MTT 値が低下し、毒性が高い結果となった。また、銀ナノ粒子はグルタチオンやミトコンドリア膜電位差の低下、活性

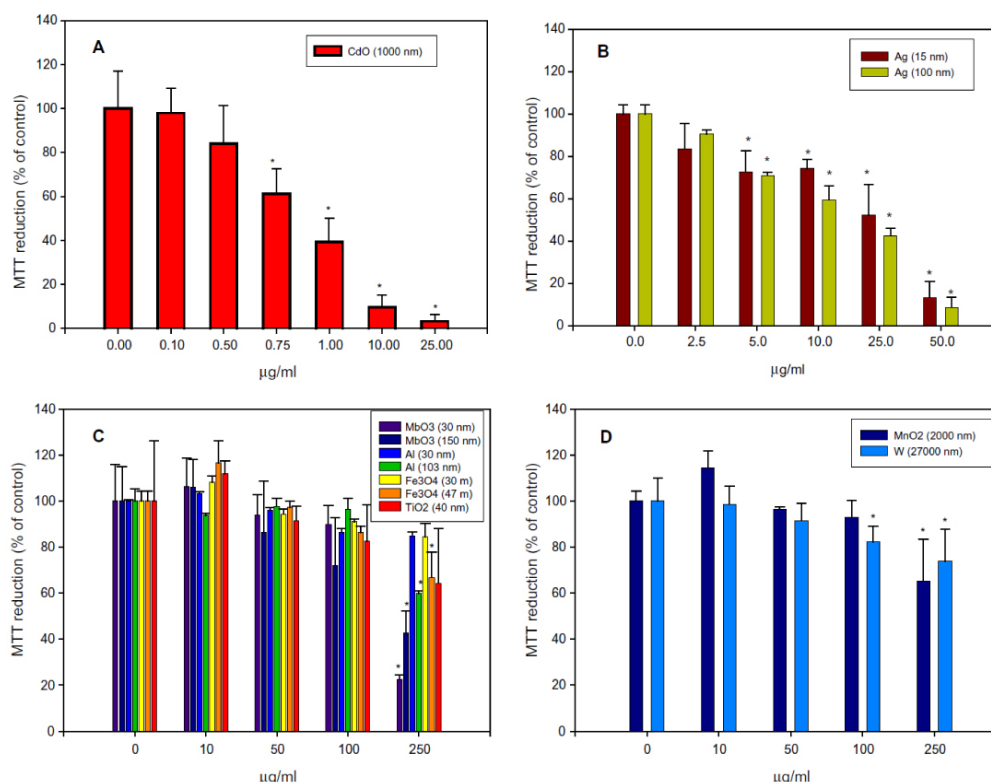


図 1-6 金属種や粒径の異なる粒子を 24 時間曝露したラット肝細胞 (BRL 3A) における MTT アッセイ⁴²

(A) : 酸化カドミウム粒子 (粒径 1000 nm), (B) : 銀ナノ粒子 (粒径 15 nm, 100 nm), (C) : 三酸化モリブデン粒子 (粒径 30 nm, 150 nm), アルミニウム粒子 (粒径 30 nm, 103 nm), 四酸化三鉄ナノ粒子 (粒径 30 nm, 47 nm), 二酸化チタンナノ粒子 (粒径 40 nm), (D) : 酸化マンガン粒子 (粒径 1~2 μm), タングステン粒子 (粒径 27 μm)

酸素種の増加など、毒性が高いことが示された。一方、三酸化モリブデン粒子、アルミニウム粒子、四酸化三鉄ナノ粒子、二酸化チタンナノ粒子、酸化マンガン粒子およびタングステン粒子は、高濃度 (250 μg/mL) で MTT 値が減少したものの、低濃度 (0~100 μg/mL) では対照群との差はほとんど見られなかった。また、粒径による毒性の違いは認められなかった⁴²。

1.3.3.5 ディーゼル排気粒子の毒性

大気中に浮遊する粒子状物質が健康影響を及ぼすことが指摘される中、ディーゼル排気由来の粒子状物質 (Diesel Exhaust Particle : DEP) が大都市を中心とした地域で大きな問題となっている。国立環境研究所では、平成 13 年度より重点特別研究「大気中微小粒子粒子状物質 (PM_{2.5})・ディーゼル排気粒子 (DEP) 等の大気中粒子状物質の動態解明と影響評価」を行い、DEP の動態および生体影響につ

いて報告した⁴³。この報告書によると、ディーゼルエンジン稼働により排出されるDEPの粒径分布は、粒径 10 nmや 60 nm付近に個数濃度のピークを持つことが明らかとなり、DEP中にはナノサイズの粒子が多く存在することが認められた。また、一般大気中で測定した粒度分布においても、粒径 20～50 nm付近に個数濃度のピークを有する単峰型の分布が観測された。このことから、我々は大気中に存在するナノ粒子に日常的に曝露されていることが示唆される。

DEPの生体影響に関する報告は、1960年代の非発がん影響に関する疫学研究をはじめに現在まで非常に多くの報告がある。1980年代には発がん影響に関する疫学研究および動物実験、1990年代には免疫・アレルギーに関する動物実験が為され、これらの報告により毒性が高いことが認められている⁴⁴。国立環境研究所の同プロジェクトでは、これらの疫学研究および動物実験の報告をまとめており、DEPが強い発がん性を示したことを報告した⁴³。DEP曝露による主な健康影響は肺がんや膀胱がん、皮膚がんなどの発がん性のほか、アレルギー性炎症反応、生殖機能に対する影響なども報告されている。DEPが毒性を持つ原因として、DEPの核をなす不溶性の元素状炭素が肺に沈着して炎症を誘発するほか、DEPに吸着した有機物や硫酸塩、金属化合物がDEPから溶出して全身へ移行し、悪影響を及ぼすことが挙げられる。また、DEPの多くはナノサイズの粒子であることから⁴³、気道内に吸入されたDEPが肺胞まで到達する割合が多いことも、毒性が高い原因の一つであると考えられる。

1.3.3.6 ナノ粒子の物理化学的特性と毒性との関連性

ナノ粒子の毒性は、粒径以外の因子にもよると考えられている。粒径以外の因子に関して、ナノ粒子の毒性を検討した文献が多数報告されている。Oberdorsterらは、曝露した粒子の表面積と毒性の相関について検討した。図 1-7 は、二酸化チタン粒子（粒径 20 nm, 250 nm）をラットに曝露した 1 日後の肺胞洗浄液にお

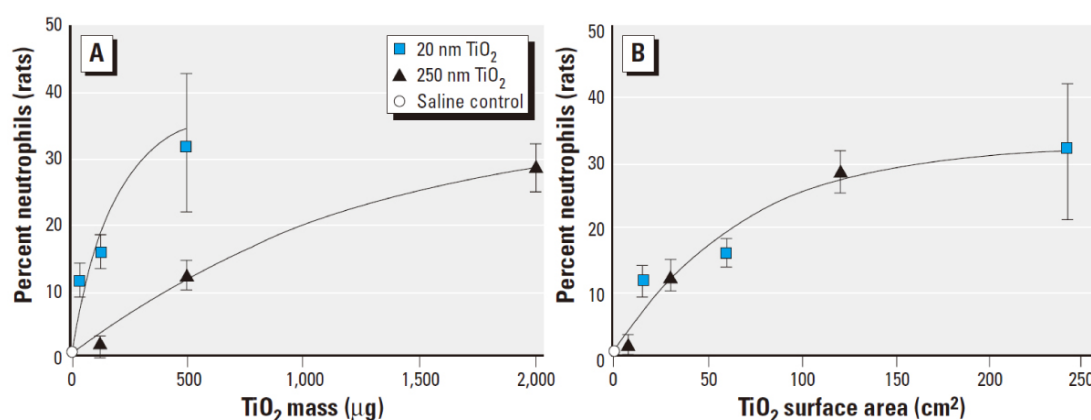


図 1-7 二酸化チタン粒子を曝露したラットにおける曝露した粒子の質量 (A), 表面積 (B) と好中球の増加との相関⁸

ける，曝露した粒子の質量当たりおよび表面積当たりの好中球の割合を示したものである。同質量当たりの好中球は 20 nm 粒子曝露群の方が多く，曝露した粒子の質量と好中球の増加との相関は見られなかった。一方，同表面積当たりの好中球は，両曝露群でほぼ等しくなった⁸。Tranらは，二酸化チタン粒子（粒径 2.1 μm ）と硫酸バリウム粒子（粒径 4.3 μm ）をラットに全身曝露し，BAL中のPMN数を分析した。その結果，Oberdorsterらの結果と同様に，同表面積当たりのPMN数が両曝露群でほぼ等しくなった⁴⁵。これらの結果は，曝露した粒子の表面積と毒性に相関がある可能性を示唆している。

粒子の表面積以外の因子も，毒性との関連がある可能性を示した文献が報告されている。Warheitらは，二酸化チタンの結晶型（アナタース，ルチル）の違いによる毒性の変化を検討した。ルチル 100%の粒子（粒径 2.1 μm ，2.9 μm ）と，アナタース 80%とルチル 20%の混合粒子（粒径 2.7 μm ）を，ラットに気管内投与したところ，混合粒子の方がBAL中のPMN数，LDH値，ミクロ蛋白値，気管気管支細胞増殖率，肺実質細胞増殖率が増加した⁴⁶。Sayesらも，結晶型の異なる二酸化チタンナノ粒子（アナタース 100%（粒径 10 nm），アナタース 60%とルチル 40%（粒径 3.2 nm），ルチル 100%（粒径 5.2 nm））の毒性を検討した。ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）およびヒトII型肺胞上皮細胞（A549）に曝露したところ，アナタース粒子曝露群で死亡率，LDH値，MTT値，IL-8 が最も大きかった⁴⁷。Nemmarらは，ポリスチレンナノ粒子（粒径 60 nm）の表面電荷を変えて，血栓量の変化を検討した。粒子の表面電荷が正電荷（アミノ基修飾），負電荷（カルボキシル基修飾），表面修飾なしの3種類のナノ粒子を，ハムスターの頸静脈内に注入したところ，アミノ基修飾の粒子投与群では対照群よりも血栓量が増加した。一方，カルボキシル基修飾の粒子投与群では血栓量が対照群よりも減少し，表面修飾なし

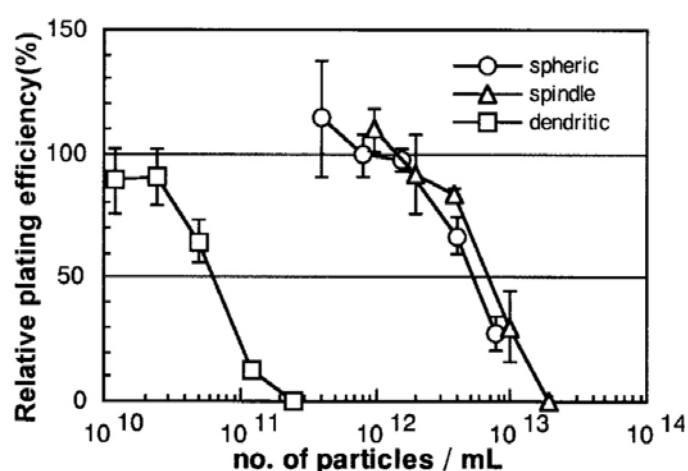


図 1-8 形状の異なる二酸化チタンナノ粒子（球状，紡錘状，樹枝状）を 6 日間曝露したマウス単球・マクロファージ細胞株（J774A.1）における個数濃度当たりの相対コロニー形成率の変化⁴¹

の粒子投与群では対照群とほとんど差は見られなかった⁴⁸。Yamamotoらは、形状の異なる二酸化チタンナノ粒子（球状（粒径 30～50 nm）、紡錘状（直径 10～20 nm、長さ 50～100 nm）、樹枝状（直径 40～70 nm、長さ 200～300 nm））を、マウス単球・マクロファージ細胞株（J774A.1）に曝露した。その結果、樹枝状粒子曝露群において、生存率の指標である相対コロニー形成率が最も低くなった（図 1-8）⁴¹。これらの報告から、ナノ粒子の毒性は粒径だけに依存しない可能性があり、粒径に加えてその他の物理化学的特性も考慮に入れた毒性評価を行う必要がある。

1.3.4 ナノ粒子のリスク評価に関する動向

ナノ粒子が毒性を持つ可能性が指摘され、その安全性をいち早く確立することが望まれている。各国際機関および各国政府では、ナノテクノロジーのより一層の発展を推進する一方で、その安全性も考慮すべく様々な取り組みを行っている。

国際標準化機構（ISO）では、2005 年にナノテクノロジー分野の国際標準化を推進するために専門委員会（TC229）を設置した。TC229 では、ナノ物質の毒性との関連が懸念される 8 つの物理化学的パラメーターを発表した（図 1-9）⁴⁹。ナノ粒子の毒性は粒径だけに依存しないことが示唆されており、これら 8 つの物理化学的パラメーターを中心にその安全性を評価することを推進している。

経済協力開発機構（OECD）では、2006 年に工業ナノ材料作業部会（WPMN）を設置し、各加盟国のナノ物質の安全性に関する取り組みを支援している。主な検討課題としては、ナノ物質のキャラクタリゼーション、ヒトや環境への影響、リスク管理の枠組みに関する評価システムの構築である。WPMN では、優先的に

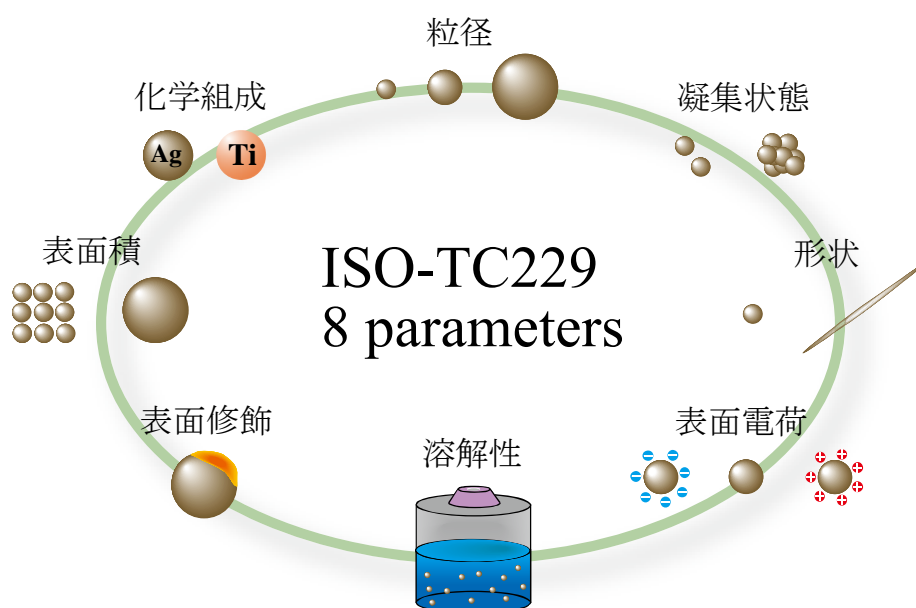


図 1-9 ISO-TC229 が発表したナノ物質の毒性との関連が懸念される物理化学的パラメーター⁴⁹

安全性の検討を進めるナノ物質として 14 物質を選定した⁵⁰。これらは 2007 年時点での国際的な商業的利用状況を勘案して選定されている。表 1-2 に、WPMN が選定した 14 物質と、厚生労働省が 2008 年に報告したこれら 14 物質の国内使用量（2006 年）⁵¹、および主な使用用途³²を示す。

各国政府でもナノ物質のリスク評価に関するプロジェクトを遂行している。米国では、国家ナノテクノロジー戦略（NNI）において環境保護庁（EPA）や国立労働安全衛生研究所（NIOSH）を中心にナノ物質のリスク評価管理を進めている。EPA では消費者の安全衛生および環境の保護に関して、NIOSH では労働者の安全衛生に関して活発に取り組んでいる。欧州では、ナノ物質のリスク評価管理に関する調査研究「Nanosafe」を進めている。本プロジェクトでは、ナノ物質のハザード情報の収集、労働者・消費者・環境のリスク評価、ヒトの健康に対するリスク評価などを目的としている。日本でもナノテクノロジーの社会的影響に関して議論が進められている。2004 年に産業技術総合研究所が主催した「ナノテクノロジーと社会」をはじめとして、文部科学省では「ナノテクノロジーの社会重要促進に関する調査研究」が 2005 年に実施され、2006 年には新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」が開始され、

表 1-2 OECD-WPMN が選定した安全性を評価すべき 14 種類の優先的ナノ物質とこれら 14 物質の国内使用量（2006 年）⁵¹および使用用途³²

ナノ物質	国内使用量（トン）	主な使用用途
フラーレン	2	スポーツ用品，化粧品
単層カーボンナノチューブ	0.1	－（研究開発中）
多層カーボンナノチューブ	60	半導体トレイ
銀ナノ粒子	50	日用品，食品密封容器
鉄ナノ粒子	～300	家電，電気電子用品
カーボンブラック	830000	タイヤ，顔料
二酸化チタン	1250	化粧品，トナー，塗料
酸化アルミニウム	700	家電，電気電子用品
酸化セリウム	～3	半導体関連の研磨剤
酸化亜鉛	480	化粧品
二酸化ケイ素	13500	シリコーンゴム，FRP，塗料
ポリスチレン	10	ディスプレイ，化粧品
樹状高分子（ dendrimer ）	50	紙用途
ナノクレイ	250	塗料，化粧品，医薬品

ナノ物質のリスク評価研究が行われている。

このように、世界各国でナノ物質の安全性評価が行われている。しかし、現時点でその安全性は確立されていない。これはナノ物質の毒性のメカニズムが非常に複雑であり、既存の研究報告も一貫性がないためである。ただ、ナノ物質の毒性評価に関してここ数年で非常に多くの報告がなされており、その毒性が次第に明らかになるようとしている。今後はこれらの研究報告に基づき、ナノ物質の毒性メカニズムを解明することが望まれている。

1.4 ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行

1.4.1 細胞内への物質の取り込み

細胞外の物質を細胞内へ取り込む機構の一つに、エンドサイトーシスがある。エンドサイトーシスは取り込む物質の大きさや種類、取り込みに関与するタンパク質の違いにより、ファゴサイトーシス、受容体依存性エンドサイトーシス、ポトサイトーシス、ピノサイトーシスの4つに分けられる。ファゴサイトーシスは、多核白血球や単球、マクロファージによる食作用である。生体外から侵入した微生物や細菌、アポトーシスによって死んだ自己の細胞の死骸などを貪食する。ファゴサイトーシスは数 μm のマикро粒子を貪食するが、ナノ粒子の食作用は不十分である。種々のサイズの粒子をラットに曝露した場合、粒径 0.5 μm , 3 μm , 10 μm の粒子は全体の 80%が肺泡マクロファージによって回収された。一方、粒径 15~80 nmの粒子は全体の 20%しかマクロファージによって回収されなかった^{17, 52, 53, 54}。受容体依存性エンドサイトーシスは、細胞膜状に存在する受容体タンパク質により有用物質を濃縮して取り込む機構である。*in vitro*の非食性細胞において、粒径 200 nm以下の粒子はクラスリンコーティングの小窩経路により細胞内へ取り込まれたと報告している⁵⁵。ポトサイトーシスは極性細胞において、カベオラというピット状の膜構造体（被服ピット）を経由して葉酸や電解質などを選択的に取り込む機構である。ピノサイトーシスは、細胞外液を取り込むことで溶け込んでいる低分子やイオンなどを非選択的に取り込む機構である。これらの取り込み機構を介して、ナノ粒子は細胞内に侵入していると考えられる。その侵入の頻度は粒子表面の組成や表面電荷など、粒子表面の特性により変化すると考えられる。

1.4.2 物質の神経細胞内輸送

神経細胞は電気信号を伝導するだけでなく、神経細胞内に存在する軸索輸送により様々な物質を輸送する。軸索輸送には細胞体で産生したタンパク質等を軸索終末へ運ぶ順行性輸送と、逆に軸索終末から物質を細胞体へ運ぶ逆行性輸送が

ある。その輸送速度は輸送される物質の種類によって様々である。

表 1-3 に、各細胞内器官の軸索輸送速度と輸送方向を示す⁵⁶。順行性輸送には、速い順行性輸送と遅い軸索輸送が存在する。速い順行性輸送では、ゴルジ小体(200～400 mm/day)⁵⁷、ミトコンドリア(<70 mm/day)⁵⁸、シナプス小胞、神経伝達物質、酵素等が輸送される。また、遅い軸索輸送では微小管やニューロフィラメント(0.2～1 mm/day)、アクチンやマイクロフィラメント(2～8 mm/day)などが輸送される⁵⁹。一方、逆行性輸送ではエンドサイトーシス小胞やシナプス小胞(100～250 mm/day)⁵⁷、成長因子、ウイルスなどの毒素等が輸送される。

1.4.3 放射性金属トレーサー曝露による嗅神経を介した中枢神経系への移行

嗅神経を介した中枢神経系への曝露経路の探索は、これまで放射性金属トレーサーを曝露することにより検討されてきた。既存の研究では、放射性金属トレーサーを吸入曝露や点鼻投与、あるいは頭蓋骨を切開して嗅球に直接注入し、曝露後の移行先をオートラジオグラフィやガンマカウンターを用いて検出している。表 1-4 に、各放射性金属トレーサー曝露による嗅神経を介して中枢神経系へ移行した部位の一覧を示す。⁵⁴MnCl₂ 吸入曝露および点鼻投与では、嗅球や嗅索、前頭基底部で放射能が有意に増加した^{60,61}。⁵⁷CoCl₂ 点鼻投与では、嗅球や前脳基底部で放射能が有意に増加した⁶²。⁶³NiCl₂ 点鼻投与では、嗅球、嗅結節、梨状葉皮質で放射能が検出された⁶³。⁶⁵ZnCl₂ では、嗅球に注入したところ梨状葉皮質、扁桃核、前交連で放射能が検出された⁶⁴。¹⁰⁹CdCl₂ では、吸入曝露⁶⁵、点鼻投与⁶⁶ともに嗅球で放射能が有意に増加し、脳ではわずかに増加した。²⁰³HgCl₂ 点鼻投与では、嗅球で放射能が有意に増加したものの、脳では変化が見られなかった^{67,68}。このように、金属種によって中枢神経系における局在部位が異なるため、中枢神経系に及ぼす影響も金属種により異なることが考えられる。

表 1-3 細胞内器官の軸索内の輸送速度と輸送方向⁵⁶

輸送される主な物質	輸送速度	方向
ゴルジ小胞	200～400 mm/day	順行性
エンドサイトーシス小胞, リソソーム, オートファゴソーム	100～250 mm/day	逆行性
ミトコンドリア	<70 mm/day	両方向
アクチン, マイクロフィラメント, サイトゾルタンパク複合体	2～8 mm/day	不明
微小管, ニューロフィラメント, チューブリン	0.2～1 mm/day	両方向

表 1-4 放射性金属トレーサーを用いた中枢神経系への移行に関する報告

金属	金属化合物	曝露方法	移行部位
Mn	$^{54}\text{MnCl}_2$	点鼻投与	嗅球, 前脳基底部
	$^{54}\text{MnCl}_2$	吸入曝露	嗅球, 嗅索
Co	$^{57}\text{CoCl}_2$	点鼻投与	嗅球, 前脳基底部
Ni	$^{63}\text{NiCl}_2$	点鼻投与	嗅球, 嗅結節, 梨状葉皮質
Zn	$^{65}\text{ZnCl}_2$	嗅球に注入	梨状葉皮質, 扁桃核, 前交連
Cd	$^{109}\text{CdCl}_2$	点鼻投与	嗅球, 脳
	$^{109}\text{CdCl}_2$	吸入曝露	嗅粘膜, 嗅球, 脳
Hg	$^{203}\text{HgCl}_2$	点鼻投与	嗅球

1.4.4 ナノ粒子曝露による嗅神経を介した中枢神経系への移行

ナノ粒子が嗅神経を介して中枢神経系へ移行する経路は, Bodianらによって初めて報告された⁶⁹。彼らはチンパンジーやアカゲザルに粒径 30 nm のポリオウイリスを点鼻投与した。その結果, ポリオウイリスが嗅球へ移行していることを確認した。また, ポリオウイリスの移動速度は 60 mm/day であった。De Lorenzo は銀コーティングされた粒径 50 nm の金ナノ粒子をリスザルに点鼻投与した⁵⁸。透過型電子顕微鏡による観察の結果, 投与から 1 時間後に嗅球の糸球体層で金ナノ粒子が確認された。嗅球で確認された金ナノ粒子は細胞質内に自由に分布するのではなく, ミトコンドリアに選択的に存在していた。金ナノ粒子の移動速度は 60 mm/day となり, ポリオウイリスの移動速度と一致した。この移動速度はミトコンドリアが輸送される速度に相当する (表 1-3)。すなわち, 金ナノ粒子がミトコンドリアと一緒に嗅球へ移行した可能性が考えられる。これらの研究により, 嗅神経にナノ粒子が侵入し, 中枢神経系へと輸送される可能性が示唆された。

近年, この移行経路の解明が Oberdorster らにより進められている。酸化マンガンナノ粒子 (直径 30 nm) をラットに吸入曝露したところ, 対照群と比べて嗅球中のマンガン量が曝露 6 日後には約 2.8 倍, 曝露 12 日後には約 3.5 倍増加した (図 1-10)。また, 右鼻を覆って左鼻のみに曝露したところ, 右の嗅球中のマンガン量は対照群と同じレベルであったが, 左の嗅球では両鼻曝露時と同じ程度のマンガンの増加が確認された⁷⁰。また別の報告では, ^{13}C ナノ粒子 (粒径 36 nm) をラットに吸入曝露し, 曝露から 1, 3, 5, 7 日後に肺, 嗅球, 大脳, 小脳を摘出したところ, 曝露 1 日後に肺, 嗅球, 大脳, 小脳中の ^{13}C 量の増加を確認した。その後, 肺, 大脳, 小脳では減少したが, 嗅球では 7 日後まで増加し続けた⁷¹。

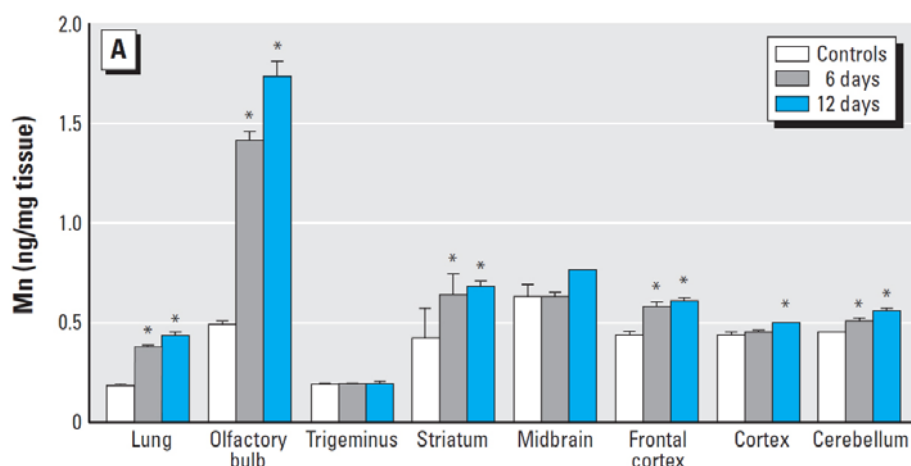


図 1-10 酸化マンガンナノ粒子（粒径 30 nm）を曝露したラットにおける曝露 6 日後および 12 日後の肺，嗅球，および各脳組織中のマンガン量⁷⁰

また，ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系の移行は粒径により影響を受けることが報告されている。Wangらは，二酸化チタンナノ粒子（粒径 25 nm, 80 nm, 150 nm）の懸濁液を，マウスに点鼻投与し，嗅球中のチタンの分布を分析した。その結果，150 nm粒子投与群の嗅球でチタンが最も多く分布し，25 nm粒子投与群では最も少なかった⁷²。またFechterらは，粒径が 1.3, 18 μm の酸化マンガン粒子を曝露したところ，嗅球でのマンガン量の増加は見られなかった⁷³。嗅神経の軸索の直径は 100~200 nmであることから⁷⁴，曝露したミクロンサイズの酸化マンガン粒子が嗅神経内に侵入しなかった可能性がある。これらの報告から，粒径が 200 nm以下の粒子は嗅神経内に侵入し，中枢神経系への移行量は必ずしも粒径に依存しないことが示唆される。

嗅覚に着目したナノ粒子の曝露経路に関する研究報告は少なく，彼らの近年の研究で明らかになってきている。しかしながら，これらの実験は嗅神経にナノ粒子が侵入し，中枢神経系に到達するという経路の解明には到っていない。ナノ粒子はリンパや血液などを介して生体内を循環する。したがって，これらの体液を介して中枢神経系へ移行した可能性も考えられ，嗅神経を介してナノ粒子が中枢神経系へ移行するという事実はまだ証明されていない。

1.5 本研究の目的

本研究では，嗅神経を介したナノ粒子の中枢神経系への移行に着目した。既存の研究では，ナノ粒子を吸入曝露もしくは点鼻投与すると，嗅球や嗅脳で曝露由来の元素量が増加したことが報告されている。しかし，嗅神経を介してナノ粒子が移行することを，顕微鏡を用いた観察により確認した報告はない。ナノ粒子の

中枢神経系への移行経路として血流を介した経路も考えられ、中枢神経系で確認されたナノ粒子が嗅神経を介して移行したかは判断できない。したがって、嗅神経経路の存在を証明するためには、ナノ粒子が嗅神経内に侵入することをイメージングにより確認する必要がある。血流を介した移行経路では、脳と血管の間に血液脳関門が存在するため、ナノ粒子が血管から脳の組織内に侵入するにはこの関門を通過しなければならない。一方、ナノ粒子が嗅神経を介して移行した場合、嗅覚二次ニューロンの軸索終末は扁桃体や梨状葉皮質など脳の組織内に投射しているため、ナノ粒子が軸索輸送により軸索終末まで到達するならば、脳の組織内に侵入する可能性は十分に考えられる。また、血流を介した中枢神経系の移行量と、嗅神経を介した移行量を定量的に比較した報告もない。したがって、この中枢神経系に特異的な嗅神経経路が定量的にどれほど寄与しているかを検討することは、中枢神経系へのナノ粒子の影響を解明する上で大きな意味を持つ。

本研究では、ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行経路の存在を明らかにすることと、この経路を介したナノ粒子の中枢神経系への移行を定量的に捉えることを目的とした。はじめに、ナノ粒子の血流を介した中枢神経系への移行を検討した。次に、ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移動経路を、顕微鏡下での観察および放射光を用いた蛍光 X 線分析を行い、イメージングによりこの経路の存在を検討した。最後に、ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行量を定量し、血流経路との比較を行った。また、粒径や表面修飾の違いによる神経細胞内への侵入量の変化も検討した。これらの検討により、ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行を解明し、ナノ粒子の中枢神経系に対するリスク評価に貢献することを最終的な目標とした。

参考文献

- 1) 東京都環境局 (2009) 東京の環境 2009, 東京都
- 2) Whitby K. T. (1978) The physical characteristics of sulfur aerosols. *Atmospheric Environment*. **12**: 135-159
- 3) ISO/TC229 (2008) Nanotechnologies – Terminology and definitions for nano-objects – Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. *ISO/TS 27687*
- 4) 細川益男, 野城清 (2003) ナノパーティクル・テクノロジー, 日刊工業新聞社 p.8
- 5) 池澤直樹 (2006) ビジネスとしてのナノテク大全, 野村総合研究所 p.115
- 6) Hughes L. S., Cass G. R., Gone J., Ames M., Olmez I. (1998) Physical and Chemical Characterization of Atmospheric Ultrafine Particles in the Los Angeles Area. *Environmental Science and Technology*. **32**: 1153-1161

-
- 7) ICRP (1994) ICRP Publication 66: Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. *Annals of the ICRP*. **24**: 1-300
 - 8) Oberdorster G., Oberdorster E. and Oberdorster J. (2005) Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*. **113**: 823-837
 - 9) Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schurch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Hof V. I., Heyder J. and Gehr P. (2005) Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environmental Health Perspectives*. **113**: 1555-1560
 - 10) Stearns R. C., Paulauskis J. D. and Godleski J. J. (2001) Endocytosis of Ultrafine Particles by A549 Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **24**: 108-115
 - 11) Nemmar A., Hoet P. H. M., Vanquickenborne B., Dinsdale D., Thomeer M., Hoylaerts M. F., Vanbilloen H., Mortelmans L. and Nemery B. (2002) Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. **105**: 411-414
 - 12) Ferin J., Oberdorster G., and Penney D. P. (1992) Pulmonary Retention of Ultrafine and Fine Particles in Rats. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **6**: 535-542
 - 13) Choi H. S., Ashitate Y., Lee J. H., Kim S. H., Matsui A., Insin N., Bawendi M. G., Semmler-Behnke M., Frangioni J. V. & Tsuda A. (2010) Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nature Biotechnology* **28**: 1300-1303
 - 14) Kreyling W.G., Semmler M., Erbe F., Mayer P., Takenaka S., Schulz H., Oberdorster G. and Ziesenis A. (2002) Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. **65**: 1513-1530
 - 15) Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Lunts A., Kreyling W. and Cox C. (2002) EXTRAPULMONARY TRANSLOCATION OF ULTRAFINE CARBON PARTICLES FOLLOWING WHOLE-BODY INHALATION EXPOSURE OF RATS. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **65**: 1531-1543
 - 16) Takenaka S., Karg E., Roth C., Schulz H., Ziesenis A., Heinzmann U., Schramel P. and Heyder J. (2001) Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environmental Health Perspectives*. **109**: 547-551
 - 17) Semmler M., Seitz J., Erbe F., Mayer P., Heyder J., Oberdorster, G. and Kreyling W. G. (2004) Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs.

-
- Inhalation Toxicology*. **16**: 453-459
- 18) Lademann J., Weigmann H., Rickmeyer C., Barthelmes H., Schaefer H., Mueller G. and Sterry W. (1999) Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*. **12**: 247-256
 - 19) The Royal Society and The Royal Academy of Engineering (2004) Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. *The Royal Society. London*: 1-116
 - 20) Warheit D. B, Laurence B. R, Reed K. L, Roach D. H, Reynolds G. A and Webb T. R. (2004) Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. *Toxicological sciences*. **77**: 117-125
 - 21) Shvedova A. A., Kisin E. R., Mercer R., Murray A. R., Johnson V. J., Potapovich A. I., Tyurina Y. Y., Gorelik O., Arepalli S., Schwegler-Berry D., Hubbs A. F., Antonini J., Evans D. E., Ku B. K., Ramsey D., Maynard A., Kagan V. E., Castranova V. and Baron P. (2005) Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice American journal of physiology. *Lung cellular and molecular physiology*. **289**: L698-L708
 - 22) Li Z., Hulderman T., Salmen R., Chapman R., Leonard S. S., Young S. H., Shvedova A., Luster M. I. and Simeonova P. P. (2007) Cardiovascular Effects of Pulmonary Exposure to Single-Wall Carbon Nanotubes. *Environmental health perspectives*. **115**: 377-382
 - 23) Lam C. W., James J. T., McCluskey R. and Hunter R. L. (2004) Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days After Intratracheal Instillation. *Toxicological sciences*. **77**: 126-134
 - 24) Carrero-Sanchez J. C., Elias A. L., Mancilla R., Arrellin G., Terrones H., Laclette J. P. and Terrones M. (2006) Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen. *Nano letters*. **6**: 1609-1616
 - 25) Nemmar A., Hoet P. H. M, Vandervoort P., Dinsdale D., Nemery B. and Hoylaerts M. F. (2007) Enhanced peripheral thrombogenicity after lung inflammation is mediated by platelet-leukocyte activation: role of P-selectin. *Journal of thrombosis and haemostasis*. **5**: 1217-1226
 - 26) Sato Y., Yokoyama A., Shibata K., Akimoto Y., Ogino S., Nodasaka Y., Kohgo T., Tamura K., Akasaka T., Uo M., Motomiya K., Jeyadevan B., Ishiguro M., Hatakeyama R., Watari F. and Tohji K. (2005) Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats in vivo. *Molecular biosystems*. **1**: 176-182

-
- 27) Renwick L. C., Brown D., Clouter A. and Donaldson K. (2004) Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types. *Occupational and Environmental Medicine*. **61**: 442-447
 - 28) Chen H. W., Su S. F., Chien C. T., Lin W. H., Yu S. L., Chou C. C., Chen J. J. and Yang P. C. (2006) Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *The FASEB journal*. **20**: E1732-E1741
 - 29) Reeves J. F., Davies S. J., Dodd D. J. F. and Jha A. N. (2008) Hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) are associated with titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research* **640**: 113-122
 - 30) Schulz J., Hohenberg H., Pflucker F., Gartner E., Will T., Pfeiffer S., Wepf R., Wendel V., Gers-Barlag H. and Wittern K. P. (2002) Distribution of sunscreens on skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **54**: S157-S163
 - 31) Menzel F., Reinert T., Vogt J. and Butz T. (2004) Investigations of percutaneous uptake of ultrafine TiO_2 particles at the high energy ion nanoprobe LIPSION. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. **219-220**: 82-86
 - 32) 環境省 (2009) 工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドライン
 - 33) Jin Y., Kannan S., Wu M. and Zhao J. X. (2007) Toxicity of Luminescent Silica Nanoparticles to Living Cells. *Chemical Research in Toxicology*. **20**: 1126-1133
 - 34) Fujiwara K., Suematsu H., Kiyomiya E., Aoki M., Sato M. and Moritoki N. (2008) Size-dependent toxicity of silica nano-particles to *Chlorella kessleri*. *Journal of Environmental Science & Health Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. **43**: 1167-1173
 - 35) Cho W. S., Choi M., Han B. S., Cho M., Oh J., Park K., Kim S. J., Kim S. H. and Jeong J. (2007) Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles. *Toxicology Letters*. **175**: 24-33
 - 36) Warheit D. B., Webb T. R., Colvin V. L., Reed K. L. and Sayes C. M. (2007) Pulmonary Bioassay Studies with Nanoscale and Fine-Quartz Particles in Rats: Toxicity is Not Dependent upon Particle Size but on Surface Characteristics. *Toxicological sciences*. **95**: 270-280
 - 37) Cho M., Cho W., Choi M., Kim J., Han B., Kim S., Kim H., Sheen Y. and Jeong J. (2009) The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicology Letters*. **189**: 177-183
 - 38) Chen Y., Chena J., Dong J. and Jin Y. (2004) Comparing study of the effect of nanosized silicon dioxide and microsized silicon dioxide on fibrogenesis in rats. *Toxicology and industrial health*. **20**: 21-27

-
- 39) Chena Z., Menga H., Xing G., Chen C., Zhao Y., Jia G., Wang T., Yuan H., Ye C., Zhao F., Chai Z., Zhu C., Fang X., Ma B. and Wan L. (2006) Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology letters*. **163**: 109-120
 - 40) Sayes C. M., Reed K. L. and Warheit D. B. (2007) Assessing Toxicity of Fine and Nanoparticles: Comparing In Vitro Measurements to In Vivo Pulmonary Toxicity Profiles. *Toxicological sciences*. **97**: 163-180
 - 41) Yamamoto A., Honma R., Sumita M. and Hanawa T. (2003) Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. *Journal of biomedical materials research*. **68A**: 244-256
 - 42) Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T. and Schlager J. J. (2005) In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*. **19**: 975-983
 - 43) 若松伸司 (2002) 大気中微少粒子状物質・ディーゼル排気粒子に関する研究の動向と今後の課題, 国立環境研究所研究報告 **172**: 1-132
 - 44) 新田裕史 (2001) ディーゼル排気ガスの危険性と汚染の現状を知る, 公開シンポジウム 2001 講演発表資料
 - 45) Tran C. L., Buchanan D., Cullen R. T., Searl A., Jones A. D. and Donaldson K. (2000) Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhalation toxicology*. **12**: 1113-1126
 - 46) Warheit D. B., Webb T. R., Reed K. L., Frerichs S. and Sayes C. M. (2007) Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology*. **230**: 90-104
 - 47) Sayes C. M., Wahi R., Kurian P. A., Liu Y., West J. L., Ausman K. D., Warheit D. B. and Colvin V. L. (2006) Correlating Nanoscale Titania Structure with Toxicity: A Cytotoxicity and Inflammatory Response Study with Human Dermal Fibroblasts and Human Lung Epithelial Cells. *Toxicological sciences*. **92**: 174-185
 - 48) Nemmar A., Hoylaerts M. F., Hoet P. H., Dinsdale D., Smith T., Xu H., Vermeylen J. and Nemery B. (2002) Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **166**: 998-1004
 - 49) ISO/TC229/WG 3 (2010) Nanotechnologie – Guidance on physico-chemical characterization for manufactured nano-objects submitted for toxicological testing. *ISO/PDTR 13014*
 - 50) OECD/WPMN (2008) List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the OECD Testing Programme (ENV/JM/MONO (2008)13/REV). *Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials*. **6**: 1-13

-
- 51) 厚生労働省 (2008) 平成 19 年度ナノマテリアルの用途・生産量調査結果報告, 第 2 回ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会, 第 2 回ナノマテリアルの安全対策に関する検討会 (第 2 回合同会合) 資料 3
- 52) Kreyling W. G., Semmler M., Erbe F., Mayer P., Takenaka S., Schulz H., Oberdörster G. and Ziesenis A. (2002) Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. **65**: 1513-1530
- 53) Oberdorster G., Ferin J. and Morrow P. E. (1992) Volumetric loading of alveolar macrophages (AM): A possible basis for diminished AM-mediated particle clearance. *Experimental Lung Research*. **18**: 87-104
- 54) Oberdorster G., Finkelstein J. N., Johnston C. Gelein R., Cox C., Baggs R. and Elder, A. C. P. (2002) Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice, *Research report (Health Effects Institute)*. **96**: 1-88
- 55) Rejman J., Oberle V., Zuhorn I. S. and Hoekstra D. (2004) Size dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*. **377**: 159-169
- 56) Anthony B. (2003) Axonal transport of membranous and nonmembranous cargoes: a unified perspective. *The Journal of Cell Biology*. **160**: 817-821
- 57) Grafstein B. and Forman D. S. (1980) Intracellular transport in neurons. *Physiological Reviews*. **60**: 1167-1283
- 58) De Lorenzo A. J. (1970) The olfactory neuron and the blood-brain barrier. *Taste and Smell in Vertebrates*. London, Churchill: 151-176
- 59) Lasek R. J., Garner J. A. and Brady S. T. (1984) Axonal transport of the cytoplasmic matrix. *The Journal of Cell Biology*. **99**: 212s-221s
- 60) Henriksson J., Tallkvist J. and Tjalve H. (1999) Transport of Manganese via the Olfactory Pathway in Rats: Dosage Dependency of the Uptake and Subcellular Distribution of the Metal in the Olfactory Epithelium and the Brain. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **156**: 119-128
- 61) Brenneeman K. A., Wong B. A., Buccellato M. A., Costa E. R., Gross E. A. and Dorman D. C. (2000) Direct olfactory transport of inhaled manganese ($^{54}\text{MnCl}_2$) to the rat brain: Toxicokinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **169**: 238-248
- 62) Persson E., Henriksson J. and Tjalve H. (2003) Uptake of Cobalt from the Nasal Mucosa into the Brain via Olfactory Pathways in Rats. *Toxicology Letters*. **145**: 19-27

-
- 63) Henriksson J., Tallkvist J. and Tjalve H. (1997) Uptake of Nickel into the Brain via Olfactory Neurons in Rats. *Toxicology Letters*. **91**: 153-162
- 64) Takeda A., Ohnuma M., Sawashita J. and Okada S. (1997) Zinc transport in the rat olfactory system. *Neuroscience Letters*. **225**: 69-71
- 65) Evans J. and Hastings L. (1992) Accumulation of Cd (II) in the CNS Depending on the Route of Administration: intraperitoneal, intratracheal or intranasal. *Fundamental and Applied Toxicology*. **19**: 275-278
- 66) Sun T. J., Miller M. L. and Hastings L. (1996) Effects of inhalation of cadmium on the rat olfactory system: Behavior and morphology. *Neurotoxicology and Teratology*. **18**: 89-98
- 67) Henriksson J. and Tjalve H. (1998) Uptake of Inorganic Mercury in the Olfactory Bulbs via Olfactory Pathways in Rats. *Environmental Research*. **77**: 130-140
- 68) BorgNeczak K. and Tjalve H. (1996) Uptake of $^{203}\text{Hg}^{2+}$ in the olfactory system in pike. *Toxicology Letters*. **84**: 107-112
- 69) Bodian D. and Howe H. A. (1941) The rate of progression of poliomyelitis virus in nerves. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*. **69**: 79-85
- 70) Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J., Potter R., Maynard A., Ito Y., Finkelstein J. and Oberdorster G. (2006) Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. *Environmental Health Perspectives*. **114**: 1172-1178
- 71) Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W. and Cox C. (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicology*. **16**: 437-445
- 72) Wang J., Chen C., Yu H., Sun J., Li B., Li Y., Gao Y., He W., Huang Y., Chai Z., Zhao Y., Deng X., Sun H. (2007) Distribution of TiO₂ particles in the olfactory bulb of mice after nasal inhalation using microbeam SRXRF mapping techniques. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*. **272**: 527-531
- 73) Fechter L. D., Johnson D. L., Lynch R. A. (2002) The relationship of particle size to olfactory nerve uptake of a non-soluble form of manganese into brain. *Neurotoxicology*. **23**: 177-183
- 74) Nomura T., Takahashi S. and Ushiki T. (2004) Cytoarchitecture of the normal rat olfactory epithelium: Light and scanning electron microscopic studies. *Archives of Histology and Cytology*. **67**: 159-170

第2章 ナノ粒子の血流を介した中枢神経系への移行

2.1 背景

ナノ粒子の体内への侵入経路は、気道を通過して肺胞まで到達したナノ粒子が血液空気関門を通過して肺胞から血管内に侵入し、血流に乗って全身に分布する経路が主要であると考えられる。既存の研究では、肺に曝露したナノ粒子が、肝臓を中心に他臓器へ移行したことが報告されている^{1,2}。しかし、肺に侵入したナノ粒子がどの程度血中に侵入するか、また血中に侵入したナノ粒子がどの程度中枢神経系へ移行するのかに関して、定量的な報告は未だなされていない。

ナノ粒子の中枢神経系への移行経路は、血流を介した経路と嗅神経を介した経路が示唆されている。既存の研究では、血流経路³と嗅神経経路^{4,5}を介してナノ粒子が中枢神経系へ移行したとの報告がある。しかし、これらの経路がどの程度中枢神経系への移行に寄与するかは分かっていない。

本章では、ナノ粒子の血流を介した中枢神経系への移行を定量的に捉えることを目的とした。はじめに、二酸化チタンナノ粒子をラットに気管内投与し、肺に侵入したナノ粒子の体内動態を検討した。次に、放射性シリカナノ粒子をマウスに尾静脈投与し、血中に侵入したナノ粒子の体内動態を検討した。これらの実験により、肺および血中に投与したナノ粒子が中枢神経系へ移行する量を明らかにし、本章で得られた血流経路でのナノ粒子の中枢神経系への移行量と、嗅神経経路での移行量を第5章で定量的に比較検討した。

2.2 二酸化チタンナノ粒子の気管内投与による体内動態

2.2.1 はじめに

二酸化チタンは常温で白色の粉末であり、化学的に無害とされた物質である。その着色力を利用し、古くから白色顔料や化粧品などに使用されている。また、光触媒作用を有する物質として注目されており、車体やビルの外壁、トイレの便器など幅広く使用されている。その触媒作用を高めるため、二酸化チタンナノ粒子を使用した製品が近年急速に増加している。2006年の二酸化チタンナノ粒子の国内使用量は1250トン/年で、二酸化チタン使用量全体の約0.5%に相当する⁶。主な用途としては、化粧品（60%）、トナー（33%）、自動車用塗料（5%）、光触媒などその他の用途（2%）であり、我々が普段使用する身近な製品に二酸化チタンナノ粒子が含まれている。

二酸化チタンナノ粒子の使用が増加するとともに、その生体影響が懸念されている。Oberdorsterらは、粒径20 nmおよび250 nmの二酸化チタン粒子をラットに吸入曝露した。

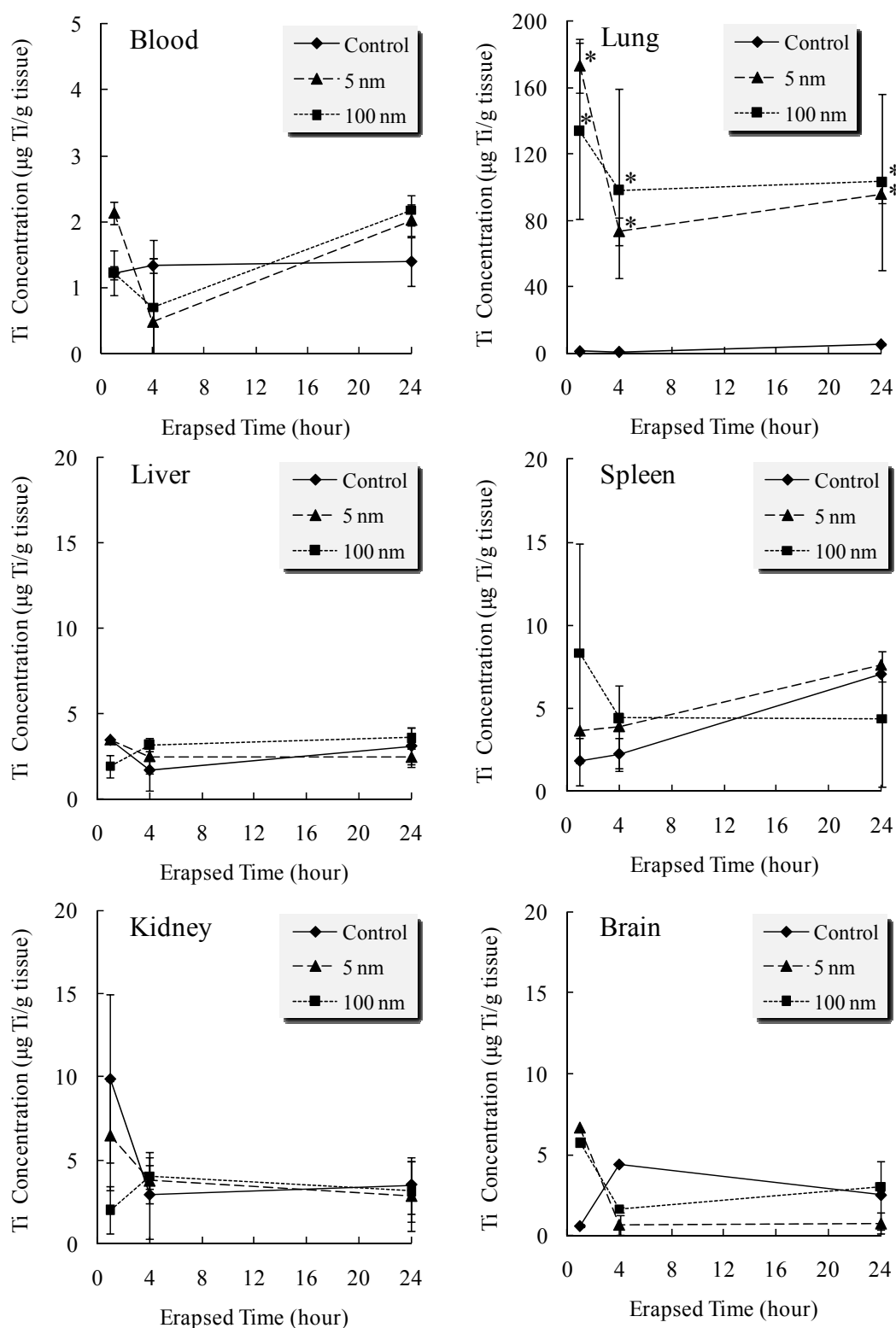


図 2-1 二酸化チタンナノ粒子（粒径 5 nm, 100 nm）を気管内投与したマウスにおける投与 1, 4, 24 時間後の血液, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 脳中のチタン重量濃度
* 対照群に対する t 検定結果 ($p < 0.05$)

その結果、総細胞数、好中球数およびマクロファージ数が対照群と比べて有意に増加した。また、粒径 20 nm の二酸化チタンナノ粒子の方が肺により長く滞留した⁷。さらに、粒径の異なる二酸化チタン粒子を同じ重量だけ曝露した場合、サイズの小さい二酸化チタン粒子の方が、毒性が大きかったことが報告された^{8,9}。これらの報告から、二酸化チタンナノ粒子がヒトに健康影響を及ぼす可能性が懸念される。

著者らは、二酸化チタンナノ粒子（粒径 5 nm, 100 nm）を BALB/c マウスに気管内投与し、PIXE 法を用いて臓器中のチタン重量濃度を定量した¹⁰。BALB/c マウス（雄, 8 週齢）に、二酸化チタンナノ粒子を重量濃度が 1.25 mg/mL となるように生理食塩水中に懸濁した液を 100 μ L 気管内投与した。投与から 1 時間後、4 時間後、24 時間後にマウスを解剖し、血液、肺、肝臓、脾臓、腎臓、大脳を摘出した。ホモジナイズ後、30~50 mg 秤量した臓器を湿式灰化にて溶解した後、サンプル内のチタン重量濃度を PIXE 法により定量した。

各サンプルの定量結果を図 2-1 に示す。縦軸はホモジナイズした臓器 1 g 当たりのチタン重量濃度 (μ g Ti/g tissue) を示し、横軸は対照群 (Control), 5 nm 粒子曝露群, 100 nm 粒子曝露群の 3 群（各 6 匹）を示している。肺では、5 nm 粒子曝露群, 100 nm 粒子曝露群でチタン重量濃度が有意に増加した。一方、肺以外の臓器や血液では、有意な差が見られなかった。この結果から、気管内投与により肺に侵入した粒子は肺内で滞留したものの、血管内への侵入および他臓器への移行は認められなかった。また、5 nm 粒子曝露群と 100 nm 粒子曝露群を比較すると、いずれのサンプルも有意な差は見られず、粒径の違いによる体内動態の変化は認められなかった。この理由として、投与した粒子量が少ないことにより、臓器へ移行したチタンを定量できなかった可能性がある。PIXE 法でのチタンの検出感度は 1~10 ppm であるため、臓器中に 1 μ g Ti/g tissue 以上のチタンが含まれていないと検出できない。また、図 2-1 より対照群の血液および臓器中には数 μ g Ti/g tissue のチタンが検出されていることから、数 μ g Ti/g tissue 程度の移行量ではこれらのバックグラウンドに埋もれてしまう可能性がある。また、PIXE 法では臓器の一部を溶解して定量するが、臓器内で粒子は均一に分布せずに局在している可能性があり、臓器全体のチタン量を正確に反映していないことも考えられる。

本実験では、粒径の異なる二酸化チタンナノ粒子（粒径 5 nm, 55 nm）をマウスに 2 回気管内投与した。解剖後、臓器全体を溶解し、ICP-MS を用いて臓器中に存在するチタンの定量を行った。これにより、粒径の違いによる二酸化チタンナノ粒子の体内動態の変化を検討した。さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM) で投与液中の二酸化チタンナノ粒子の挙動を観察し、粒子の分散性を検討した。

2.2.2 実験方法

2.2.2.1 二酸化チタンナノ粒子のラット気管内投与とチタン重量濃度の定量

本実験では、Wistar ラット（雄, 7 週齢）を 9 匹用いた。実験群は対照群 (Control), 5 nm 粒子（純度 99.7%, アナタース結晶型, SUPELCO 社製）曝露群, 55 nm 粒子（ホソカワミ

クロン社製)曝露群の3群(各3匹)とした。各二酸化チタンナノ粒子を滅菌生理食塩水に0.5 mg TiO₂/mL saline となるよう懸濁し、これを投与試料とした。投与直前に20分間超音波撹拌を行い、懸濁液中の粒子を分散させた後、各ラットに0.5 mg TiO₂/kg body weight (平均体重: 約230 g)の濃度で二酸化チタンナノ粒子を気管内投与した。1回目の投与から2日後に、同様の方法で2回目の投与を行った。2回目の投与から24時間後にラットを解剖し、血液を採取した後、肺、肝臓、脾臓、腎臓を摘出した。これらの臓器を凍結乾燥器で十分に乾燥させ、乾燥重量を秤量した。秤量後、臓器をマイクロウェーブ装置用のテフロン容器に入れ、硝酸7 mL, フッ化水素酸3 mL, インジウム(内部標準試料)を秤量した乾燥重量に対して1 ppm 添加し、マイクロウェーブ湿式分解装置(MDS2000, CEM 社製)を用いて湿式灰化した。試料が室温になるまで静置した後、4%ホウ酸水溶液30 mL を添加し、マイクロウェーブ湿式分解装置を用いて再度灰化处理した。この溶液を、ろ過滅菌フィルター(マイレクス, 孔径0.45 µm, ミリポア社製)でろ過し、ろ過後の溶液をICP-MS (HP-4500, Hewlett Packard 社製)を用いて定量分析を行った。ICP-MS の分析条件は、プラズマガス流量15.1 L/min, 補助ガス流量1.0 L/min, キャリアガス流量1.18 L/min, 質量数ごとの積分時間3秒, 1試料の測定繰り返し回数3回とした。装置に試料を導入後、試料の置換時間を30秒, ペリスティックポンプによる試料の置換速度を0.50 rps, 安定化待機時間を30秒とし、試料中のチタン重量濃度を定量した。

2.2.2.2 走査型電子顕微鏡を用いた二酸化チタンナノ粒子の観察

2.2.2.1 で用いた粒径5 nm と55 nm の二酸化チタンナノ粒子を、電子天秤で1 mg 秤量し、ビーカーに入れた。これに生理食塩水40 mL を加え、ガラス棒で撹拌した。7分間超音波撹拌を行った後、ガラス棒で再度撹拌し、さらに3分間超音波撹拌を行った。この溶液を10 µL 採取し、真鍮に貼り付けたカーボンテープ上に、液滴が平らになるように滴下した。これを常温で乾燥させ、その液滴痕をSEM 観察試料とした。SEM 内に試料を導入する前に、白金コーティングを行った。白金コーティングにより試料に導電性を持たせ、チャージアップを防ぐとともに二次電子の発生を高めた。試料の表面を、電流20 mA, 照射時間30秒で白金コーティングを行い、粒径5 nm の試料は5回、粒径55 nm の試料は7回この操作を繰り返した。白金コーティング後、試料をSEM 内に導入して観察した。SEM はJSM-5600 (日本電子社製)を使用した。加速電圧を15 kV, 対物レンズ下面から試料までの距離(作動距離)を20 mm, 電子ビームを調整するためのスポットサイズを18~25, フィラメント電流を33~60 µA とした。試料は450~10000 倍の倍率で観察した。

2.2.3 結果

図2-2 に、ICP-MS を用いた血液中および臓器中のチタン重量濃度の定量結果を示す。縦軸は臓器の乾燥重量1 g 中のチタン重量濃度(µg Ti/g tissue)を示している。横軸は対照群(Control), 5 nm 粒子曝露群, 55 nm 粒子曝露群の3群(各3匹)を示している。肺中では、

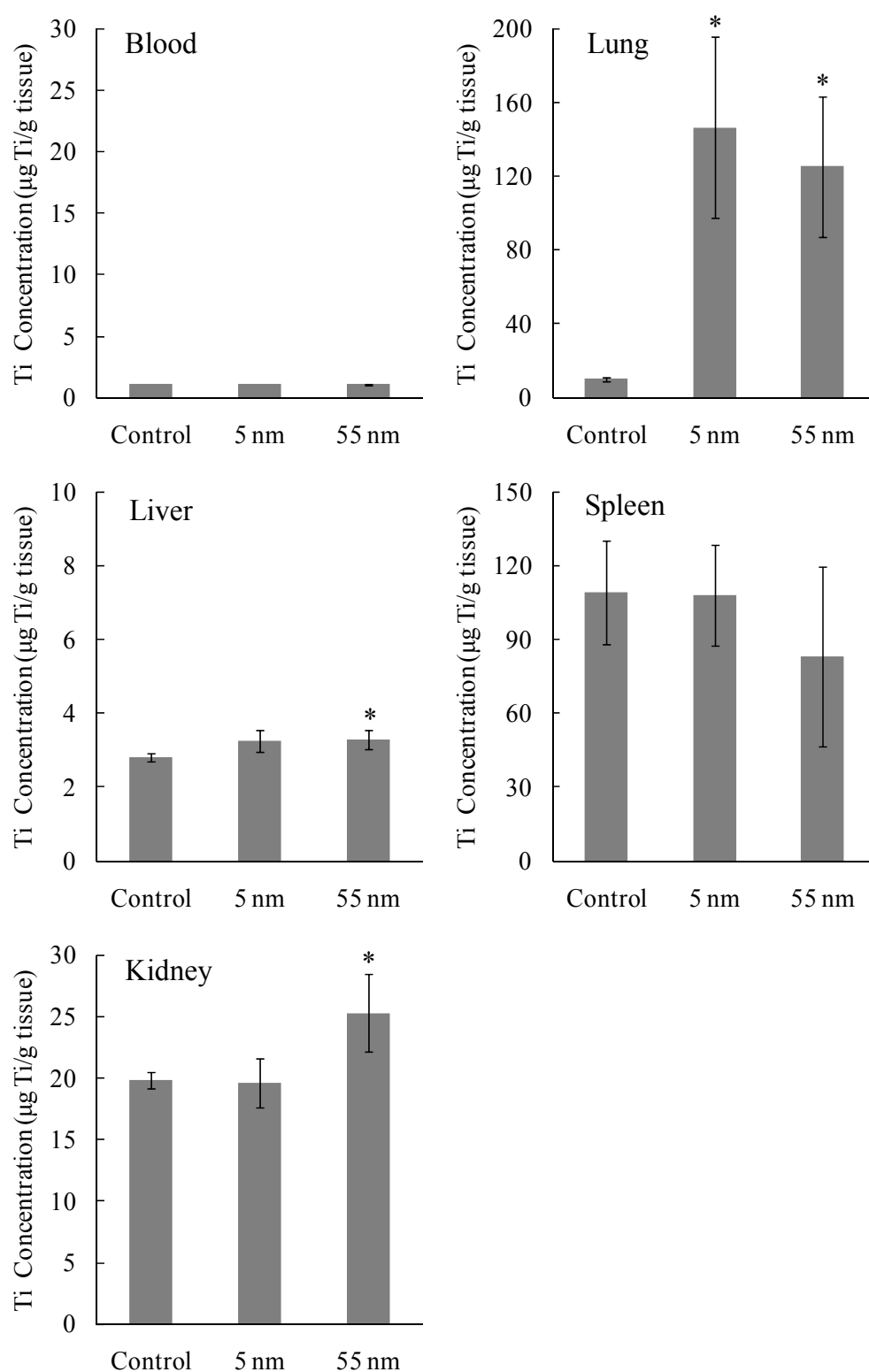


図 2-2 二酸化チタンナノ粒子（粒径 5 nm, 55 nm）を気管内投与したラットにおける投与 24 時間後の血液，肺，肝臓，脾臓，腎臓中のチタン重量濃度

* 対照群に対する t 検定結果 ($p < 0.05$)

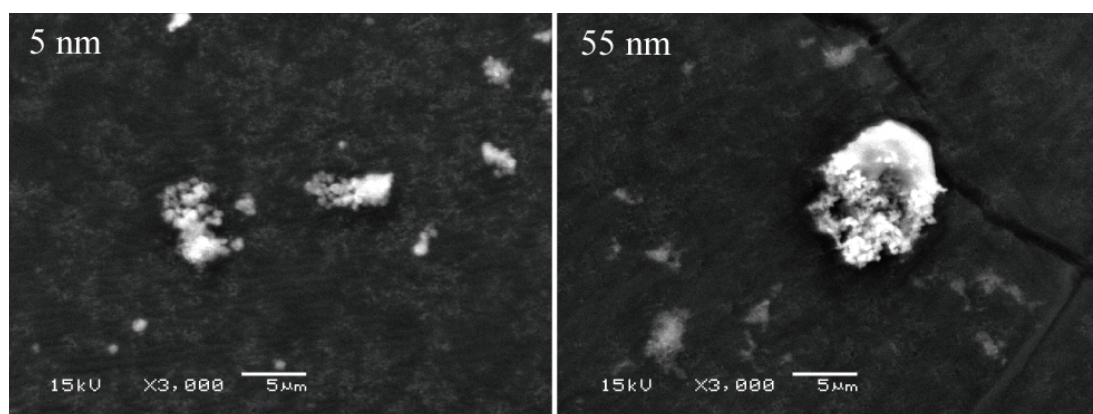


図 2-3 生理食塩水中に懸濁した二酸化チタンナノ粒子の SEM 画像（倍率 3000 倍）
（左）：二酸化チタンナノ粒子（5 nm），（右）：二酸化チタンナノ粒子（55 nm）

チタン重量濃度が対照群（10 $\mu\text{g Ti/g tissue}$ ）と比べて 5 nm 粒子曝露群（147 $\mu\text{g Ti/g tissue}$ ），55 nm 粒子曝露群（125 $\mu\text{g Ti/g tissue}$ ）で有意に増加した。肝臓中では，55 nm 粒子曝露群（3.3 $\mu\text{g Ti/g tissue}$ ）で対照群（2.8 $\mu\text{g Ti/g tissue}$ ）よりもチタン重量濃度が有意に増加した。一方，腎臓中では 55 nm 粒子曝露群（25 $\mu\text{g Ti/g tissue}$ ）で対照群（20 $\mu\text{g Ti/g tissue}$ ）よりも有意に増加したものの，5 nm 粒子曝露群（20 $\mu\text{g Ti/g tissue}$ ）では対照群と有意な差は見られなかった。また，血液中および脾臓中では，対照群と曝露群で有意な差は見られなかった。

図 2-3 は，SEM により観察された二酸化チタンナノ粒子である。5 nm 粒子，55 nm 粒子ともに，粒径が数 μm ～10 μm の凝集体で観察された。

2.2.4 考察

肺中ではチタン重量濃度が有意に増加し，対照群と比べて 5 nm 粒子曝露群では約 14 倍，55 nm 粒子曝露群では約 12 倍チタン重量濃度が増加した。このことから，気管内に投与された二酸化チタンナノ粒子は肺中で滞留したと考えられる。しかし，血液中では曝露群でチタン重量濃度の増加は認められなかった。この理由として，三つの可能性が考えられる。

一つ目に，肺胞の呼吸部である呼吸細気管支や肺胞上皮が最も薄い肺胞嚢に，投与液が到達していない可能性がある。気管から肺胞嚢に向かうまでに，分岐回数は 23 回に及ぶ。肺胞に至るまでに存在する解剖学的死腔に投与液が滞留していた場合，粒子が血管内に侵入することは考えにくい。

二つ目に，呼吸部に投与液は到達していたが，二酸化チタンナノ粒子が肺胞から血管内に侵入しなかった可能性がある。肺胞内に到達した投与液中の粒子が，毛細血管内の血液に入るためには，(1) 肺胞上皮，(2) 基底膜，(3) 毛細血管内皮の 3 層（血液空気関門，厚さ約 0.5 μm ）を通過する必要がある。Muhlfeldらの報告では，二酸化チタンナノ粒子（粒径 22 nm）を吸入曝露したラットの肺胞上皮，結合組織および毛細血管内腔において，曝露から 1 時間後および 24 時間後に粒子が確認された¹¹。この結果は二酸化チタンナノ粒子が

血液空気関門を通過することを示唆している。しかし、本実験では血液中への移行は認められなかった。この理由として、二酸化チタンナノ粒子が気管内に投与した時点で既に凝集していたことにより、血液空気関門を通過できなかったことが考えられる。SEMを用いた懸濁液中の二酸化チタンナノ粒子の観察により、粒子がミクロンオーダーまで凝集していることが確認された。したがって、投与前に超音波攪拌を行ったにもかかわらず、ほとんどの粒子がミクロンオーダーの凝集体として投与された可能性が高い。二酸化チタンの等電点は、ルチルがpH 5.5、アナターズがpH 6 で¹²、生理食塩水はpH 7.2 であるので、二酸化チタンナノ粒子のゼータ電位は生理食塩水中で負になる。粒子表面の帯電により、粒子間での電氣的反発を生み凝集を抑制するが、イオン強度の大きい溶媒に懸濁すると、粒子表面の電氣的反発が抑制され、凝集が促進される。生理食塩水にはナトリウムイオンや、カルシウムイオンなどが豊富に含まれており、生理食塩水の中では二酸化チタンナノ粒子の凝集が促進されることが報告されている¹³。このため、投与する以前に二酸化チタンナノ粒子が凝集したことにより、肺から血管内への侵入が起こりにくかったと考えられる。

三つ目に、気管内に投与された粒子の一部は血管内に侵入したが、投与 24 時間後には血中から他の臓器に移行した可能性がある。55 nm 粒子曝露群では肝臓中および腎臓中でチタン重量濃度が有意に増加した。したがって、気管内に投与された 55 nm 粒子の一部は血管内に侵入し、これらの臓器へ移行した可能性がある。血中ではチタン重量濃度が増加しなかったため、血中に侵入した 55 nm 粒子は投与 24 時間後には血中からこれらの臓器に移行したと考えられる。一方、5 nm 粒子曝露群では、臓器中でもチタン重量濃度の増加は認められなかった。このことから、気管内に投与された 5 nm 粒子は肺から組織内に侵入せずに肺中に滞留した可能性がある。また、一部の粒子は組織内に侵入したものの、曝露 24 時間後には尿や糞中へ排泄された可能性も考えられる。

55 nm粒子曝露群の肝臓中と腎臓中でチタン重量濃度を比較すると、腎臓中の方がより顕著に増加した。腎臓の糸球体には尿をろ過するためのフィルターが存在する。直径 4 nm以下の分子は自由に通過することが出来るが、直径 8 nm以上の分子は通過しにくい構造となっている¹⁴。そのため、血中に侵入した 55 nm粒子はこのフィルターにトラップされ、腎臓内で蓄積した可能性がある。

2.3 放射性シリカ粒子の尾静脈投与による体内動態

2.3.1 はじめに

シリカナノ粒子は製剤、化粧品、プリンターのトナー、塗料、食品添加物など幅広く利用されている¹⁵。その使用量は食品中で最大 2%、化粧品で約 20%が配合されており、我々の生活に欠かせない物質となっている¹⁶。したがって、シリカナノ粒子が経口や経気道、経皮経路で曝露される機会が増加しており、その安全性を十分に考慮する必要がある。

シリカナノ粒子の体内動態に関して、過去にいくつか報告がある。Xieらは、シリカナノ粒子（粒径 20 nm, 80 nm）をマウスに尾静脈投与したところ、20 nm粒子投与群の肺、肝臓、脾臓で 80 nm粒子投与群よりも粒子が多く移行した¹⁷。Heらは、シリカナノ粒子（粒径<45 nm）をマウスに曝露したところ、尿中で粒子が確認された¹⁸。しかし、これらの報告は定量分析が行われていなかったり、主要な臓器のみの粒子の移行を検討していたりと、シリカナノ粒子の体内動態を解明するまでには至っていない。

シリカナノ粒子はゾル・ゲル法（ストーバー法）を用いることで容易に作成でき¹⁹、またテトラエトキシシラン（TEOS）やアンモニアの量を調整することでナノサイズからサブミクロンサイズまで粒径をコントロールすることができる²⁰。さらに、Miyoshiらはトリチウム-アデノシン三リン酸で標識したシリカナノ粒子（ $^3\text{H-ATP-SiO}_2$ ）をストーバー法により調整し、放射能を有するシリカナノ粒子を作成することに成功した²¹。ナノ粒子は粒子 1 個当たりの重量が非常に小さく、定量が非常に困難である。しかし、Miyoshiらの手法を用いてナノ粒子をアイソトープで標識することにより、放射能を測定することで検出が容易となり、定量的な評価も可能となる。

本実験では、 ^3H よりも測定効率の高い ^{14}C で標識したシリカ粒子（ $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ 粒子）を、Miyoshi らの手法を用いて調整した。限外ろ過と遠心分離を用いて $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ ナノ粒子および $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ サブミクロン粒子の懸濁液を調整し、それぞれマウスに尾静脈投与を行った。これにより、血中に侵入したシリカ粒子の粒径の違いによる体内動態の変化を検討した。血液および 19 種類の組織を摘出し、それらに含まれる放射能を定量した。また、尿中および糞中の放射能も定量し、体内動態と合わせて排泄の動態を検討した。

2.3.2 実験方法

2.3.2.1 $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ 粒子の調整

$^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ 粒子を、限外ろ過と遠心分離を用いて投与前に調整した。アデノシン 5'-ニリン酸三ナトリウム（ $^{14}\text{C-ADP}$, 740 kBq/mL, Perkin Elmer 社製）30 μL と、シランカップリング試薬（Fluka 社製）1 μL に蒸留水 0.5 mL, エタノール 0.5 mL を加えて室温で混合した。この溶液に、TEOS（Wako 社製）2 μL , エタノール 30 μL , 水酸化アンモニウム 10 μL を添加し、7~8 日間、室温で重合反応させた。重合反応完了後、攪拌式限外ろ過装置（Model 8003 series, ミリポア社製）を用いて限外ろ過を行い、凝集した粒子を取り除いた。はじめに、孔径 30 nm 以下のメンブレンフィルター（YM-100, ミリポア社製）を用いて、粒径が 30 nm より大きい $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ 粒子を取り除いた。得られたろ液を、孔径 6 nm 以下のメンブレンフィルター（YM-10, ミリポア社製）を用いて限外ろ過を行い、装置本体に残った懸濁液 1 mL を回収した。この操作により、 $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ 粒子より解離した $^{14}\text{C-ADP}$ がろ液として排出され、残った懸濁液に粒径が 6~30 nm の $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ 粒子を回収することができる。限外ろ過後の懸濁液に、塩化ナトリウムを終濃度が 0.9% となるように添加し、血液中の塩分濃度と同等にした。さらに、この懸濁液を遠心分離（12000 g, 10 分間）するこ

とにより，懸濁液内に存在するサブミクロンサイズ以上の粒子を沈降させた。こうして得られた限外ろ過後の懸濁液および遠心分離後の懸濁液を，体内動態実験での投与液とした。また，これらの懸濁液に含まれる ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の粒度分布（個数分布）を，粒径測定システム（ELSZ-0，大塚電子社製）を用いて測定した。測定する粒径の範囲を 1～5000 nm と設定して粒度分布を測定し，懸濁液中に存在する粒子のピーク粒径と粒径範囲を求めた。

さらに，限外ろ過後の懸濁液中に含まれる ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子を，透過型電子顕微鏡（TEM，JEM-2010，日本電子社製）にて観察した。限外ろ過により調整した ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子懸濁液 2 μL を，コロジオン膜付 TEM グリッド（日新 EM 社製）の上に滴下し，1 晩室温で静置した。翌日，グリッドを真空乾燥機内に入れて 24 時間真空引きを行い，試料を完全に乾燥させた。このグリッドを TEM に導入し，加速電圧 200 kV にて ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子を観察した。

各投与試料液中の放射能を，液体シンチレーションカウンター（LSC-5100，Aloca 社製）にて定量した。 ^{14}C の測定効率は 89.6% であった。分析条件として，各サンプルの測定時間 5 分，繰り返し測定回数 1 回とした。得られた放射能（Bq）と粒度分布で得られたピーク粒径から， ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の重量濃度を下記の式より算出した。

$$C_{\text{weight}} = C_{\text{number}} \times W_{\text{particle}} \quad (1)$$

C_{weight} : ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の重量濃度（mg/mL）

C_{number} : ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の個数濃度（particle/mL）

W_{particle} : ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子 1 個の重量（mg/particle）

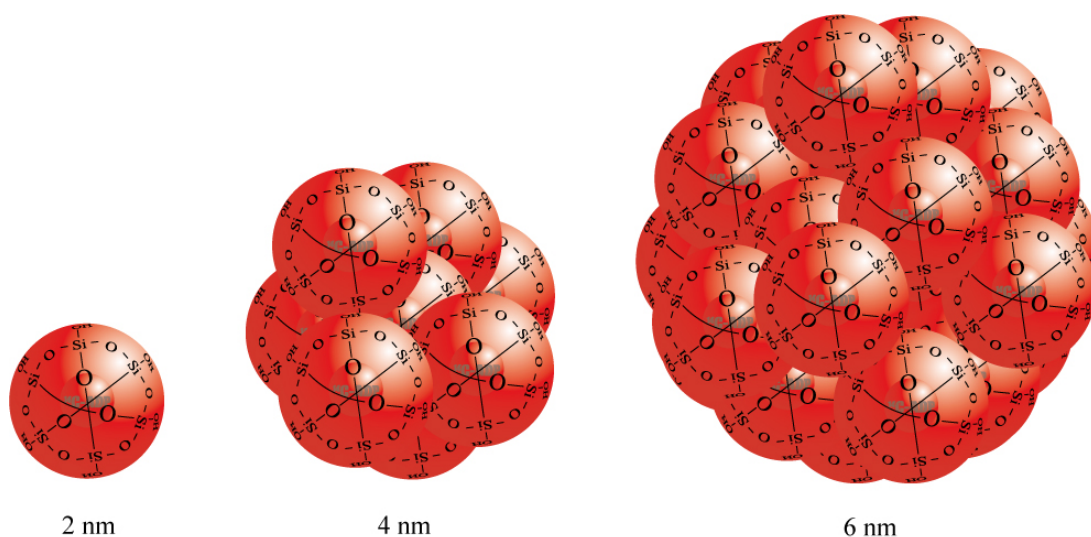


図 2-4 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の構造*

* 粒径が 2 nm の ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子に ^{14}C -ADP が 1 分子含まれている。4 nm 粒子は 8 個の 2 nm 粒子，6 nm 粒子は 27 個の 2 nm 粒子で構成され，球状の粒子を形成する。

調整された ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子は、粒径が 2 nm の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が結合して構成された粒子で、1 個の粒子に ^{14}C -ADP が 1 分子含まれていると仮定した (図 2-4)。これは、粒径が 2 nm の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子中に放射能が確認されたことに基づいている。この仮定の下、測定された懸濁液中の放射能 (Bq) と ^{14}C の半減期 (5730 年) より算出される懸濁液中の ^{14}C 原子数を、粒度分布で得られたピーク粒径の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子 1 個あたりに含まれる ^{14}C 原子数で除することで C_{number} を求めた。 W_{particle} はシリカ密度 (2.3×10^{-18} mg/nm³) と粒子体積の積で求めた。

2.3.2.2 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子のマウス尾静脈投与と放射能測定試料の作成

本実験では、ICR マウス (雄, 8 週齢) を計 32 匹用いた。実験群は、対照群 (2 匹), 限外ろ過後の懸濁液投与群 (15 匹), 遠心分離後の懸濁液投与群 (15 匹) の 3 群とした。投与する直前に、各マウスにアバーチン麻酔液 (1.25% トリブロモエタノール) を 0.025 mL/g body weight となるように腹腔内注射した。麻酔完了後、限外ろ過後の懸濁液投与群には 0.073 mg SiO₂/kg body weight, 遠心分離後の懸濁液投与群には 0.12 mg SiO₂/kg body weight となるように、 ^{14}C -ADP-SiO₂ 懸濁液を尾静脈注射した。投与から 1, 2, 4, 8, 24 時間後に、各時間 3 匹ずつアバーチン麻酔液を腹腔内注射し、左心室より採血を行った。その後、開腹、開胸し、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、盲腸、小腸、大腸、胃腸管内容物、皮膚、筋肉 (大腿筋)、骨 (大腿骨)、リンパ節 (頸部リンパ節と顎下リンパ節)、脳、嗅球を摘出した。血液は 0.2 mL を分注してシンチレーションバイアルに入れ、ソルエン 350 (Perkin Elmer 社製) とイソプロピルアルコール (Wako 社製) の混合液 (1:1, v/v) を 1 mL 添加した後、50°C で 15 分間加温した。加温後、30% 過酸化水素水を 0.5 mL 添加して脱色し、ハイオニックフロー (Perkin Elmer 社製) を 10 mL 添加した溶液を測定対象試料とした。骨は電子天秤にて秤量後、そのままシンチレーションバイアルに入れ、硝酸と過塩素酸の混合液 (1:1, v/v) を 1 mL 添加した後、60°C で 1 時間加温して骨を溶解した。加温後、ハイオニックフローを 10 mL 添加した溶液を測定対象試料とした。その他の組織は、電子天秤にて全重量を秤量後、細かく刻んでホモジナイズし、150 mg (肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、盲腸、脳) あるいは 75 mg (小腸、大腸、胃腸管内容物、筋肉、皮膚) となるように秤量した組織をシンチレーションバイアルに入れた。リンパ節と嗅球は重量が小さいため、全量をシンチレーションバイアルに入れた。ソルエン 350 を 1 mL 添加した後、50°C で一晩静置して組織を溶解した。加温後、ハイオニックフローを 15 mL (肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、盲腸、脳) あるいは 10 mL (小腸、大腸、胃腸管内容物、筋肉、皮膚、リンパ節、嗅球) 添加した溶液を測定対象試料とした。

2.3.2.3 放射能の測定および組織中粒子重量濃度の算出

各サンプル中の放射能を、液体シンチレーションカウンターにて定量した。分析条件として、各サンプルの測定時間 5 分、繰り返し測定回数 1 回とした。得られた放射能 (Bq)

第2章 ナノ粒子の血流を介した中枢神経系への移行

から各組織全体に含まれる放射能を、下記の式より算出した。

$$R_{tissue} = (R_{exp}/W_{exp} - R_{control}/W_{control}) \times W_{tissue} \quad (2)$$

- R_{tissue} : 組織全体に含まれる放射能 (Bq)
 R_{exp} : 曝露群の秤量した組織中に含まれる放射能 (Bq)
 $R_{control}$: 対照群の秤量した組織中に含まれる放射能 (Bq)
 W_{exp} : 曝露群の秤量した組織の重量 (mg)
 $W_{control}$: 対照群の秤量した組織の重量 (mg)
 W_{tissue} : 曝露群の組織全体の重量 (mg)

皮膚、筋肉、骨、リンパ節は組織全体を摘出することができないため、組織全体の重量を秤量することができなかった。そこで、これらの組織の全重量は各組織の体全体に対する割合を報告した文献を引用して求めた²²。また、血液に関しても同様に、血液の体全体に対する割合を報告した文献を引用して、血液全量を求めた²³。

投与した放射能に対する各組織中の放射能の百分率と、全組織中の放射能の百分率の総和は下記の式により算出した。

$$P_{tissue} = R_{tissue}/R_{injected} \times 100 \quad (3)$$

$$P_{body} = \sum P_{tissue} \quad (4)$$

- P_{tissue} : 投与した放射能に対する各組織中の放射能の百分率 (%)
 P_{body} : 投与した放射能に対する全組織中の放射能の百分率 (%)
 $R_{injected}$: 投与した放射能 (Bq)

各組織中の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子重量濃度は下記の式より算出した。

$$C_{tissue} = M_{injected} \times P_{tissue}/W_{tissue} \quad (5)$$

- C_{tissue} : 各組織中に含まれる ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子重量濃度 (pg SiO₂/mg tissue)
 $M_{injected}$: 投与した ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子重量 (pg)

$M_{injected}$ は (1) 式より算出された C_{weight} に、投与した懸濁液の容量 (mL) を乗じて求めた。限外ろ過後の懸濁液投与群、遠心分離後の懸濁液投与群それぞれで算出された P_{tissue} と C_{tissue} より、粒径の違いによる ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の体内動態の変化を検討した。

2.3.2.4 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子のマウス尾静脈投与による排泄実験

2.3.2.1 と同様の方法で、 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子を調整した。遠心分離は行わず、限外ろ過後に得られた懸濁液を投与液とした。この懸濁液に塩化ナトリウムを終濃度が 0.9% となるよ

うに添加した後、粒径測定システムを用いて粒度分布を測定した。

投与する動物として、マウス（ICR，雄，8週齢）を5匹用いた。実験群は，対照群（1匹），投与群（4匹）の2群とした。投与群のマウスに，アバーチン麻酔液を0.025 mL/g body weight となるように腹腔内注射した。麻酔完了後， ^{14}C -ADP-SiO₂ 懸濁液を0.083 mg SiO₂/kg body weight となるように尾静脈注射した。それぞれのマウスを個々の代謝ケージに入れ，尿と糞を採取した。投与から6時間後と，1～7日後まで毎日尿と糞を採取し，採取後は冷蔵庫に保存した。7日後，各採取時間の尿をそれぞれ電子天秤で秤量し，その全量を個々のシンチレーションバイアルに入れた。ハイオニックフローを18 mL 添加した溶液を，測定対象試料とした。糞は各採取時間の糞をそれぞれ電子天秤で秤量した後，50 mg 秤量して個々のシンチレーションバイアルに入れた。蒸留水0.25 mL を添加して軽くホモジナイズした後，ソルエン350 を2 mL 添加して50℃で2時間加温し，糞を溶解した。加温後，ハイオニックフローを18 mL 添加し，この溶液を測定対象試料とした。(1)～(4)式により，尿および糞に含まれる放射能の投与量に対する百分率を算出した。

2.3.3 結果

図2-5は限外ろ過後および遠心分離後の懸濁液中に含まれる ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の粒度分布結果である。各懸濁液中に含まれる ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子のピーク粒径は，体内動態実験で用いた遠心分離後の懸濁液が11 nm，限外ろ過後の懸濁液が130 nm，排泄実験で用いた限外ろ過後の懸濁液が106 nmであった（以下，これらの懸濁液を ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子， ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）， ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（106 nm）と記す）。各懸濁液中の粒径範囲は， ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子が10.2～15.0 nm， ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）が104～333 nm， ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（106 nm）が85.8～274 nmであった。

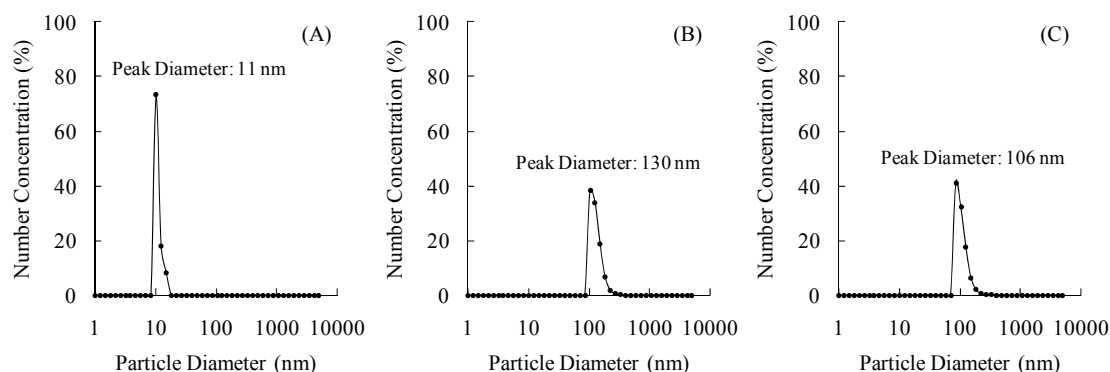


図2-5 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の粒度分布

(A) : ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子 (11 nm)，(B) : ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm)，
(C) : ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (106 nm)

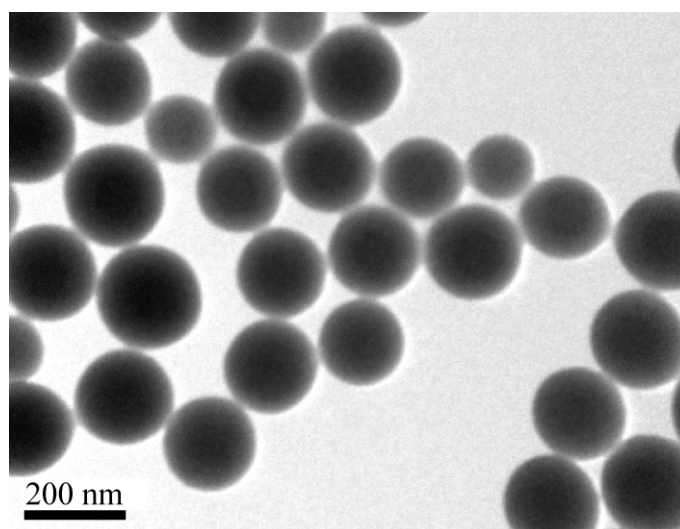


図 2-6 限外ろ過後に得られた ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子の TEM 画像 (倍率 10 万倍)

図 2-6 は TEM にて観察された限外ろ過後の懸濁液に含まれる ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子である。この画像から、限外ろ過後の ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子は粒径が 150～200 nm まで凝集していることが分かった。この TEM 観察用に使用した懸濁液中の粒度分布を測定したところ、ピーク粒径は 167 nm となり同様の結果が得られた。したがって、限外ろ過後の ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子はサブミクロンサイズまで凝集を起こしていることが確認された。

図 2-7 に、 ^{14}C -ADP- SiO_2 ナノ粒子投与群および ^{14}C -ADP- SiO_2 サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群の血液中および各組織中における ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子重量濃度の経時変化を示す。 ^{14}C -ADP- SiO_2 ナノ粒子投与群では、血液中で投与 2 時間後まで ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子重量濃度が増加した (465 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$)。その後、投与 8 時間後まで緩やかに減少し (429 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$)、さらに投与 8 時間後から 24 時間後の間に急激に減少した (291 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$)。投与から 24 時間後、 ^{14}C -ADP- SiO_2 ナノ粒子は主に心臓 (376 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$)、肺 (466 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$)、脾臓 (315 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$)、リンパ節 (412 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$) へ移行した。心臓と肺では、 ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子重量濃度が一時的に増加したり減少したりした。心臓、脾臓、リンパ節、盲腸、肝臓、小腸、骨では投与 8 時間後から 24 時間後の間に顕著に ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子重量濃度が増加した。

一方、 ^{14}C -ADP- SiO_2 サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群では、血液中の粒子重量濃度が投与 1 時間後 (251 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$) から 24 時間後 (174 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$) まで減少し続けた。投与から 24 時間後、 ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子は主に心臓 (186 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$)、肺 (206 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$)、脾臓 (138 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$)、リンパ節 (106 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$)、腎臓 (184 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$) へ移行した。心臓、肺、小腸、大腸、骨、皮膚、筋肉では、投与 2 時間後に一時的に ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子重量濃度が減少し、投与 4 時間後では増加した。一方、リンパ節、盲腸、嗅球、胃腸管内容物、脳では、投与 2 時間後に一時的に ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子重量濃度が増加し、投与 4 時間後では減少した。腎臓では、投与 8 時間後 (150 pg $\text{SiO}_2/\text{mg tissue}$)

第2章 ナノ粒子の血流を介した中枢神経系への移行

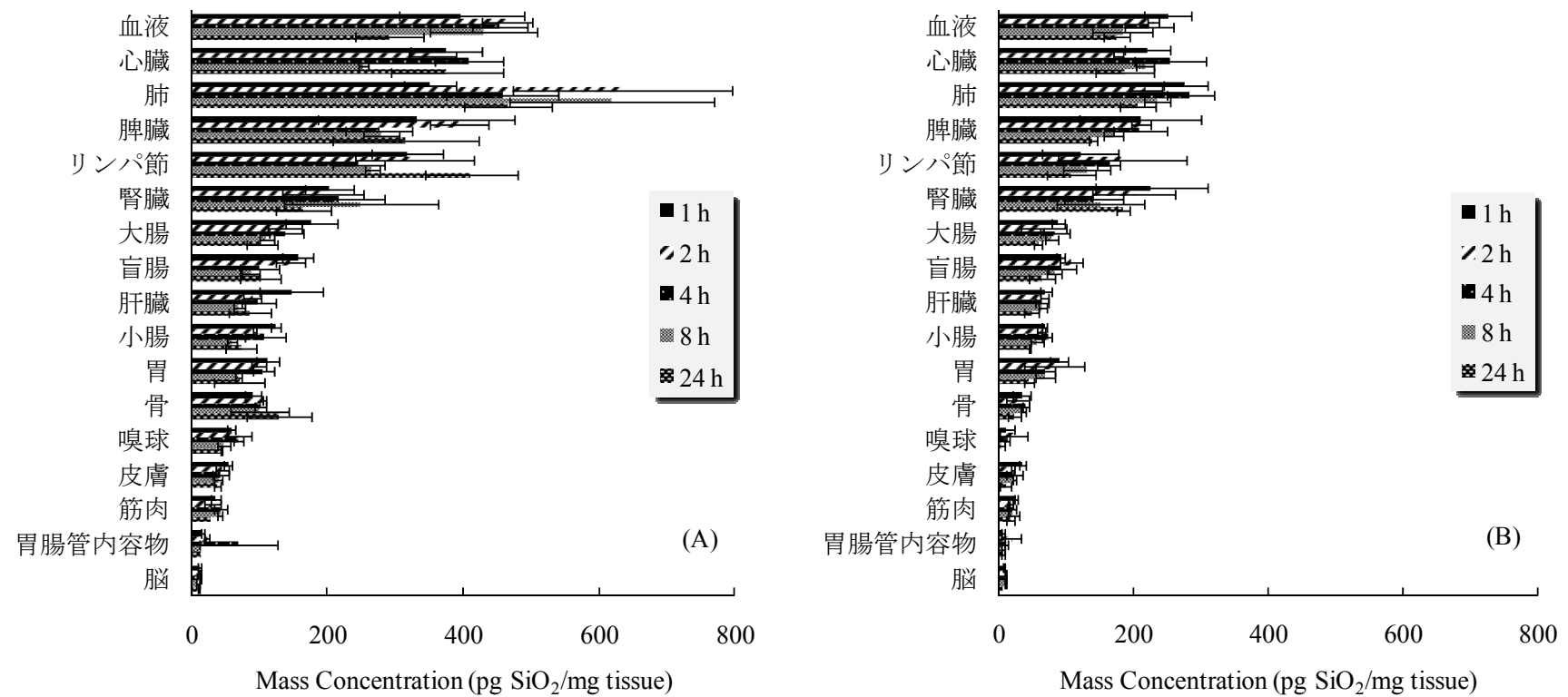


図 2-7 ^{14}C -ADP- SiO_2 粒子を尾静脈投与したマウスの血液中および各組織中における粒子重量濃度の経時変化
(A) : ^{14}C -ADP- SiO_2 ナノ粒子 (11 nm) 投与群, (B) : ^{14}C -ADP- SiO_2 サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群

第2章 ナノ粒子の血流を介した中枢神経系への移行

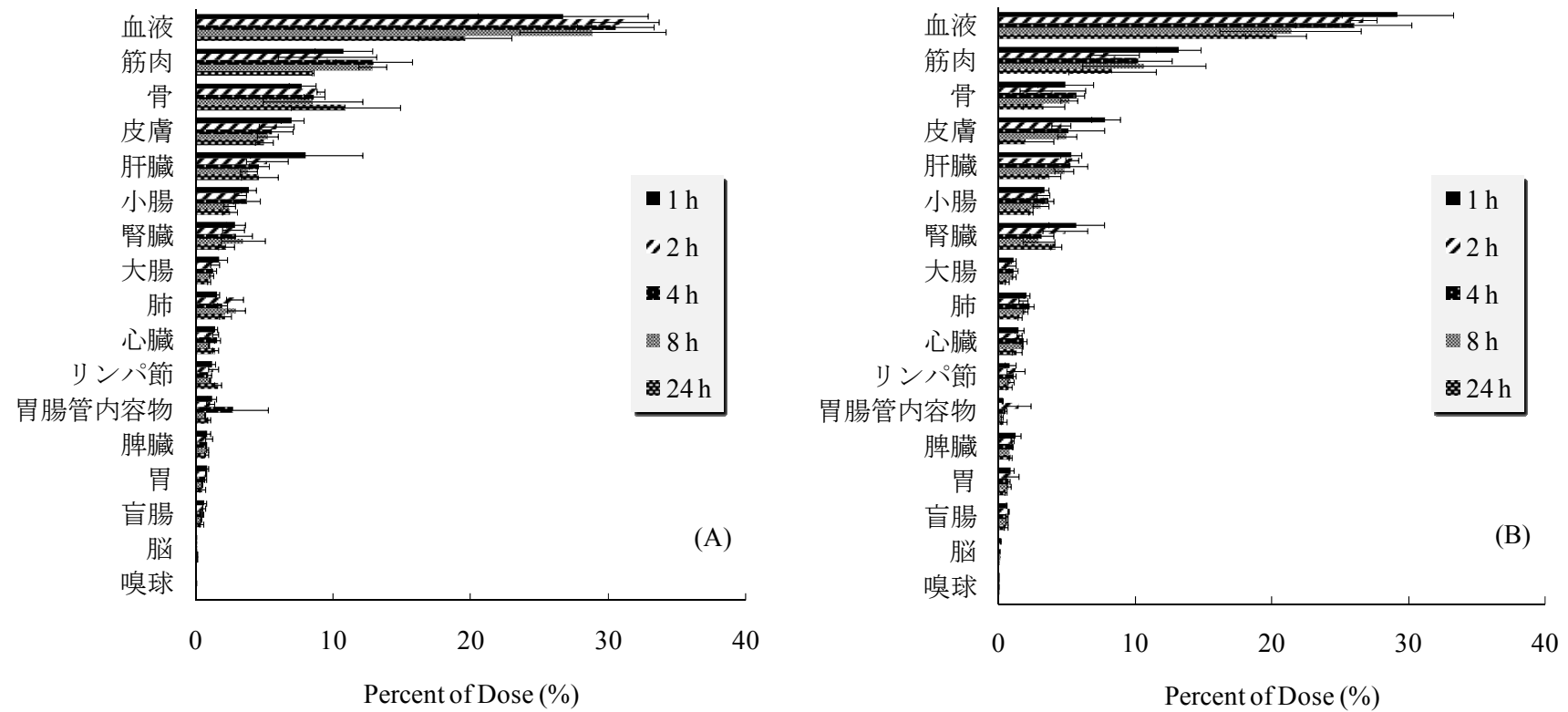


図 2-8 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子を尾静脈投与したマウスの血液中および各組織中における投与量に対する百分率の経時変化

(A) : ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子 (11 nm) 投与群, (B) : ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群

まで ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子重量濃度が減少し続けたが、投与 24 時間後には増加した (184 pg SiO₂/mg tissue)。

図 2-8 は ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群, ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群の各組織における、投与量に対する百分率 (以下、血液中の百分率は滞留率、各組織中の百分率は移行率と記す) の経時変化を表している。 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群, ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群ともに、血液中で最も ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が滞留していた。両群を比較すると、投与 8 時間後まで、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群の方が ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群よりも血液中でより多く滞留していた。しかし、投与 24 時間後の滞留率は、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群で 20%, ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群でも 20% となり、ほぼ同じ割合の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が血液中に留まっていた。組織中では、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群, ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群ともに、筋肉、骨、皮膚、肝臓、小腸、腎臓で移行率が大きくなった。投与 24 時間後、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群の骨 (11%), 皮膚 (5.0%), リンパ節 (1.6%) では、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群の骨 (3.3%), 皮膚 (2.0%), リンパ節 (0.73%) よりも 2 倍以上の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が移行していた。一方、投与 24 時間後の腎臓では、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群の腎臓 (4.2%) で、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群の腎臓 (2.2%) の 2 倍近くの ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が移行していた。胃、小腸、大腸、盲腸では両群間の差はほとんど見られなかった。しかし、胃腸管内容物では ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群 (1.0%) で、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群 (0.37%) の 2.6 倍の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が移行していた。脳や嗅球へはほとんど移行せず、移行率は両群ともに 0.2% 以下だった。

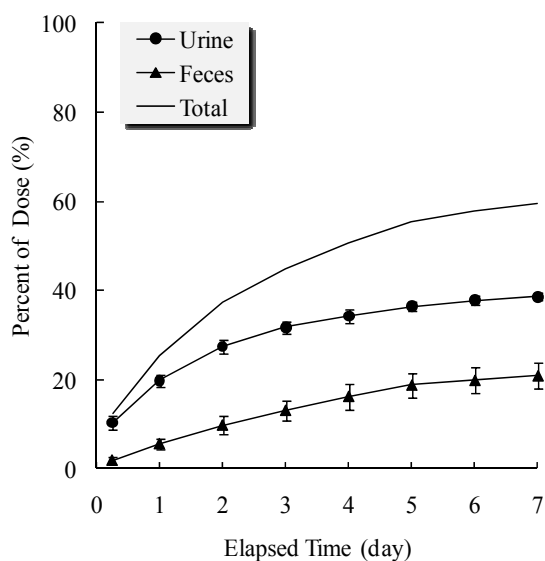


図 2-9 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (106 nm) を尾静脈投与したマウスにおける尿中および糞中への排泄率の経時変化

図 2-9 は ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (106 nm) を尾静脈投与したマウスにおける、尿中および糞中へ排泄された粒子の投与量に対する百分率 (以下、排泄率と記す) を示している。尿中への排泄率は次第に減少し、投与 1 日後で 20%, 2 日後で 7.6%, 3 日後で 4.3%, 7 日後で 0.77% であった。投与後 7 日間における尿中への総排泄率は 39% であった。一方、糞中への排泄率は、投与 5 日後までほぼ一定 (2.6~4.2%) であった。その後やや減少し、投与 6 日後で 1.1%, 7 日後で 1.0% であった。投与後 7 日間における糞中への総排泄率は 21% であった。したがって、尿中および糞中への投与後 7 日間の総排泄率は 60% となった。

図 2-10 は ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群および ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群の血液中および全組織中に存在する ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の総和 (以下、体内滞留率と記す) を示している。投与 1 時間後の体内滞留率は ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群で 77%, ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群で 78% とほぼ同じ値となった。しかし、投与 2 時間後では、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群ではほぼ変化がなかったのに対し、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群では急激に減少した。その後は両群ともほぼ同じ挙動を示し、経過時間とともに次第に体内滞留率が減少した。投与 24 時間後の体内滞留率は、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群で 62%, ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群で 51% となった。

2.3.4 考察

本実験では、 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子懸濁液を限外ろ過および遠心分離により調整し、尾静脈投与用の試料とした。孔径の異なる 2 種類のメンブレンフィルターを使用して限外ろ過を行い、粒径が 6~30 nm の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が含まれる懸濁液を作成した。しかし、限外

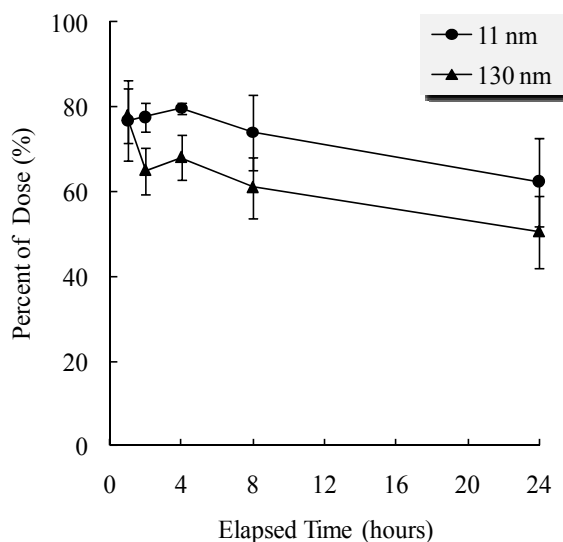


図 2-10 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子 (11 nm) および ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) を尾静脈投与したマウスにおける体内滞留率の経時変化

ろ過後の粒径のピークは 130 nm, 106 nm となりサブミクロンサイズまで凝集していた。限外ろ過では、ろ過前の懸濁液を徐々に装置内に導入しながらろ過するため、メンブレンフィルターを通過できずに装置本体に残っている粒子の個数濃度が次第に大きくなる。したがって、個数濃度が大きくなることにより粒子間の距離が次第に小さくなり、凝集を引き起こした可能性が考えられる。

尾静脈投与後の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の投与量に対する百分率は、投与 24 時間後まで全組織のうち血液が最も高くなった。この理由として、 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子と他の組織との相互作用が起こりにくく、血管内で循環し続けたことが考えられる。Xieらは、 ^{125}I 標識シリカナノ粒子（粒径 20 nm, 80 nm）をマウスに尾静脈投与したところ、投与 24 時間後の血液中の滞留率は 20 nm粒子, 80 nm粒子ともに 0.06%となった¹⁷。したがって、血中に投与された粒子のほとんどは組織中へ移行しており、本実験で得られた投与 24 時間後の血液中の滞留率（約 20%）と大きく異なった。これは標識に用いたアイソトープや投与した粒子の個数濃度が異なることから、 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の血液内での凝集や粒子表面へのタンパク質の吸着などの挙動が変わり、滞留率に影響を及ぼしたことが考えられる。本実験では、血液中の粒子の挙動を追跡することができず、血液中の粒子の粒径やタンパク質の結合状態を把握することはできなかった。血液中の粒径は動的光散乱法を用いた粒度分布装置では測定することができず、またTEMでは多量に存在する赤血球の影響により粒子の観察が難しく、その粒径を把握することはできない。しかし、血液中の粒子の挙動は他の組織への移行、蓄積に大きく影響すると考えられ、今後血液中の粒径を把握するための分析方法を確立する必要がある。

シリカの等電点はpH 2.3 で、血液のpHは約 7.4 であるため、血中では ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の等電点からかなりアルカリ側に傾いたpH環境下に存在することになる。このため、 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の表面は負に帯電し、電気的反発により凝集を抑制していると推測できる。しかし、Surらの研究により、粒子表面のゼータ電位はタンパク質の吸着により減少することが報告されており²⁴、それに伴う電気的反発力の低下により凝集を引き起こしている可能性も考えられる。De Paoli Lacerdaらは、金ナノ粒子（粒径 5 nm, 60 nm, 100 nm）にアルブミンなど血液中のタンパク質を添加したところ、タンパク質の吸着により凝集が起きることを確認した²⁵。この報告からも、 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が血液中で凝集を起こし、血液中で滞留し続けたことが考えられる。

血液中の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の動態を比較すると、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群の方が ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群よりも血液中に多く滞留した。Oberdorsterらがまとめたナノサイズからミクロンサイズの粒子を吸入曝露した過去の文献のレビューでは、粒径が 0.5 μm , 3 μm , 10 μm の粒子は曝露量の約 80%の粒子が曝露 24 時間後には肺胞マクロファージにより貪食されたが、粒径が 15~20 nmの粒子は曝露量の約 20%しか貪食されなかったと報告した²⁶。したがって、サブミクロン粒子やマイクロ粒子の方がナノ粒子よりも貪食作用を受けやすいことが考えられ、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm)

の方が ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子よりも貪食作用を受けて、血液中から取り除かれた可能性が考えられる。投与 24 時間後では、両群の血液中の滞留率はほぼ等しくなった（～20%）。したがって、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子が血液中で次第に凝集し、粒径が大きくなったことで貪食作用を受けやすくなり、組織中に取り込まれたことが考えられる。

両群の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子は主に心臓、肺、脾臓、リンパ節へ移行した。既存の研究では、曝露されたナノ粒子が、心臓およびリンパ節の内皮細胞^{27, 28}、肺泡マクロファージ²⁹、脾臓マクロファージ³⁰に取り込まれたことが報告されている。またリンパ節では、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群の方が ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）投与群と比べて 2.2 倍多く取り込まれた。Heckelらは、尾静脈投与した金ナノ粒子（粒径 8 nm）が、リンパ節の内皮細胞を通過しリンパ節内に侵入したと報告した²⁸。したがって、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子も同様にリンパ節へ侵入したことが考えられ、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）よりも頻繁にリンパ節へ侵入したと考えられる。

一方、投与 24 時間後における肝臓への ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の移行率は、両群ともに投与量の 5%以下だった。既存の研究では、肝臓への移行率は曝露した粒子によって大きく変化している。Yamagoらは、 ^{14}C 標識フラーレンをラットに経口投与したところ、投与 16 時間後に、投与量の約 92%が肝臓へ移行していた³¹。同様にCagleらは、 ^{166}Ho 標識フラーレンをマウスに尾静脈投与したところ、投与 4 時間後に、投与量の約 25%が肝臓へ移行していた³²。一方で、Burnsらは、蛍光シリカナノ粒子（粒径 3.3 nm, 6 nm）をマウスへ尾静脈投与したところ、肝臓への移行量は投与量の 10%以下だった³³。これらの報告より、肝臓へのナノ粒子の蓄積は粒子の物理化学的特性によると考えられ、 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子は肝臓への蓄積性が低いことが考えられる。

^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）投与群では、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群よりも腎臓に多く蓄積した。この理由として、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）は腎臓の糸球体に存在するフィルターにトラップされてそのまま蓄積したことが考えられる。一般的に、粒径 4 nm以下の分子は糸球体のフィルターを自由に通過できるが、粒径 8 nm以上の粒子は通過しにくくなる¹⁴。Choiらが行った $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識量子ドットのマウスへの尾静脈投与実験においても、粒径が 5.5 nmの量子ドットでは投与 4 時間後に投与量の 50%が排泄されたが、粒径が 15 nm以上の量子ドットはほとんど尿中へ排泄されず、粒径が大きくなるにつれて尿中への排泄量が減少した³⁴。一方、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（106 nm）を用いた排泄実験では、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（106 nm）の尿中への排泄が確認され、投与後 7 日間で 39%が尿中へ排泄された。また、過去にもナノ粒子が尿中へ排泄された報告がある。Kreylingらは、 ^{192}Ir 標識イリジウムナノ粒子（粒径 15 nm, 80 nm）をラットに気管内投与したところ、7日後までに投与量の 60%が尿中へ排泄された³⁵。さらに、Singhらは、単層カーボンナノチューブ（直径 1 nm, 長さ 300～1000 nm）および多層カーボンナノチューブ（直径 20～30 nm, 長さ 500～2000 nm）が尿中へ排泄されたことを確認した³⁶。これらの報告から考えられる可能性として、一つ目に ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が体内を循環する

間に代謝あるいは溶解により糸球体のフィルターを通過できるほど小さな粒径になった可能性がある。二つ目に、糸球体がナノ粒子により損傷を受け、より大きな粒子が通過できるようになった可能性がある。L’Azouらは、カーボンブラックナノ粒子（粒径 13 nm, 20 nm, 95 nm）および二酸化チタンナノ粒子（粒径 15 nm, 50 nm）が腎臓の糸球体メサンギウム細胞に細胞毒性を引き起こしたことを報告した³⁷。したがって、 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子曝露により糸球体が損傷を受け、サブミクロンサイズの ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子も糸球体のフィルターを通過できるようになったことが考えられる。

^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）投与群ともに、胃腸管内容物中に ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が確認された。投与後 24 時間の間に、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群では投与量の 6.7%、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）投与群では投与量の 2.8%の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が胃腸管内容物に含まれていた。これは肝臓へ移行した ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が、胆汁と一緒に十二指腸で分泌され、胃腸管内容物と混入した可能性がある。投与 1 時間後における肝臓での移行率は、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群が 8.0%、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）投与群が 5.3%であることから、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群の方がより多く肝臓から胃腸管内容物へ移行したことが考えられる。また、両群とも胃腸管で ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が確認されていることから、消化・吸収の過程で胃液や腸液と一緒に ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が分泌され、胃腸管内容物に混入した可能性もある。排泄実験では、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（106 nm）投与群の糞中から ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が確認され、投与 1 日後までに投与量の 5.6%が糞中へ排泄された。この値は ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群よりも低く（6.7%）、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）投与群よりも高い（2.8%）ことから、粒径が小さい粒子の方がより多く糞中へ排泄されており、粒径が小さな粒子の方が糞中へ排泄されやすいことが示唆される。

各組織中に存在する ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の移行率は、筋肉、骨、皮膚で大きかった。これは体全体に占める筋肉、骨、皮膚の割合が、他の組織に比べて相対的に大きいためである。組織 1 mg 当たりの ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子重量濃度で評価した場合、各臓器中の方が筋肉、骨、皮膚よりも高い値を示した。このことから、臓器中の方が筋肉、骨、皮膚よりも蓄積性が高い可能性がある。投与 24 時間後の ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群と ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）投与群の骨中の移行率を比較すると、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群では 11%となり、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）投与群の移行率（3.3%）より約 3.3 倍高いことが分かった。Bazileらは、ヒト血漿アルブミンでコーティングされたポリ乳酸ナノ粒子（粒径 90～250 nm）をラットに尾静脈投与したところ、ポリ乳酸ナノ粒子が骨髄中に局在したことを報告した³⁸。したがって、骨中で確認された ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子は骨髄に局在している可能性がある。さらに、皮膚内の ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の移行率も ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群の方が ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）投与群より約 2.5 倍多かった。これらの結果から、粒径の違いが骨や皮膚への移行率に影響を及ぼしていると考えられる。

^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群, ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群ともに, 血中に投与した ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子は脳や嗅球へはほとんど移行しないことが確認された。Nemmarらは, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識金ナノ粒子 (粒径<80 nm) をハムスターに気管内投与したところ, 投与 30 分後に, 投与量の 1.52%が血液中へ移行し, 0.05%が脳中へ移行したと報告した³。すなわち, 血液中に侵入した金ナノ粒子の内, 脳へは 0.32%移行したことを示している。脳と血管との間には血液脳関門が存在し, 血中から脳の組織内への移行は血液脳関門により制御されているため, この関門が粒子の侵入を妨げていると推測される。

体内滞留率は投与後徐々に減少し, ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群では投与 1 時間後から 24 時間後の間に 27%減少した。同様に, 排泄実験では投与 1 日後までに 26%が尿や糞中に排泄されており, ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群の体内滞留率の減少量とほぼ等しくなった。この結果から, 体内滞留率の減少は排泄による減少であることが示唆される。この場合, ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子投与群では体内滞留率が投与 1 時間後から 24 時間後の間に 14%減少するに留まったため, ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 投与群と比較すると尿や糞中へ排泄されにくく, 体内でより多く滞留することが推測できる。また, 本実験では単回投与による体内動態を検討したが, 慢性的に投与した場合, 粒子が組織中に徐々に蓄積され健康影響を及ぼす可能性も懸念される。

2.4 結論

本章では, ナノ粒子の血流を介した体内動態を検討した。ナノテクノロジーに幅広く応用される二酸化チタンナノ粒子とシリカナノ粒子に着目し, 気管内に侵入した場合および血管内に侵入した場合の体内動態を検討した。二酸化チタンナノ粒子の気管内投与による体内動態実験では, 粒子の懸濁液中での凝集が肺から他臓器への移行に影響したと考えられた。ミクロンサイズまで凝集した二酸化チタンナノ粒子は, 肺中で滞留するに留まり, 血液中の移行は認められなかった。この結果は, 凝集した粒子が組織内に侵入することができず, 肺にそのまま滞留するか, クリアランスを受けて排出されることを示唆している。既存の研究では, 肺胞に侵入したナノ粒子が血管内に侵入し, 他臓器へ移行したと多数報告されており^{1,2,3,35}, 粒径が組織内への侵入に寄与しているものと考えられる。ナノ粒子は様々な物理化学的条件により容易に凝集するため, もし肺胞に到達するまでに粒子が凝集した場合, 本章での二酸化チタンナノ粒子の体内動態実験のように, 肺胞から血管内への侵入に大きく影響すると推測される。すなわち, 気管内に侵入後のナノ粒子の挙動を把握することが重要であると言える。

^{14}C -ADP 標識シリカ粒子の体内動態実験では, 血中に投与された粒子が心臓, 肺, 脾臓, リンパ節を中心に, 各組織へ移行した。また, その動態は投与された粒径によって異なった。 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子を投与したマウスの骨, 皮膚, リンパ節, 胃腸管内容物では,

^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) よりも2倍以上多く粒子が移行した。さらに、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の方がより多く組織全体に移行したため、粒径が小さくなるほど体内に蓄積する量が増加する可能性が示唆された。シリカナノ粒子は主要なナノマテリアルの一つとして、ナノテク市場で広く使用されている。したがって、その体内動態を把握することは、シリカナノ粒子のリスク評価を行う上で非常に重要である。

本章における体内動態実験では、ナノ粒子が脳中へほとんど移行しなかった。既存の研究においても、血液から脳への移行は確認されているものの、その移行量はわずかであった³。この理由として、血液脳関門により脳の組織内への侵入を防いでいる可能性が考えられる。一方、嗅神経を介したナノ粒子の脳への移行がOberdorsterらの研究で報告されている^{4,5}。したがって、中枢神経系に特異的である嗅神経経路が、ナノ粒子の中枢神経系への移行量にどの程度寄与しているかは解明すべき課題である。血流経路と嗅神経経路の寄与を定量的に比較検討した報告はなされておらず、この課題を解決する意義は高い。

参考文献

- 1) Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Lunts A., Kreyling W. and Cox C. (2002) EXTRAPULMONARY TRANSLOCATION OF ULTRAFINE CARBON PARTICLES FOLLOWING WHOLE-BODY INHALATION EXPOSURE OF RATS. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. **65**: 1531-1543
- 2) Takenaka S., Karg E., Roth C., Schulz H., Ziesenis A., Heinzmann U., Schramel P. and Heyder J. (2001) Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environmental Health Perspectives*. **109**: 547-551
- 3) Nemmar A., Vanbilloen H., Hoylaerts M. F., Hoet P. H. M., Verbruggen A. and Nemery B. (2001) Passage of Intratracheally Instilled Ultrafine Particles from the Lung into the Systemic Circulation in Hamster. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **164**: 1665-1668
- 4) Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W. and Cox C. (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicology*. **16**: 437-445
- 5) Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J., Potter R., Maynard A., Ito Y., Finkelstein J. and Oberdörster G. (2006) Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System: Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. *Environmental Health Perspectives*. **114**: 1172-1178
- 6) 環境省 (2009) 工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドライン: 1-55
- 7) Oberdorster G., Ferin J. and Lehnert B. E. (1994) CORRELATION BETWEEN PARTICLE-SIZE, IN-VIVO PARTICLE PERSISTENCE, AND LUNG INJURY.

-
- Environmental Health Perspectives.* **102**: 173-179
- 8) Ferin J., Oberdorster G. and Penney D. P. (1992) Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *American Journal of Respiratory and Cell Molecular Biology.* **6**: 535-542
 - 9) Renwick L.C., Brown D., Clouter D. and Donaldson K. (2004) Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particles types. *Occupational and Environmental Medicine.* **61**: 442-447
 - 10) Sakai N., Matsui Y., Yamamoto S., Sera K., Fujimaki H. and Uchiyama I. (2008) Biodistribution of ultrafine particles of titanium dioxide by intratracheal administration to mice. *Journal of UOEH* **30**: 27-38
 - 11) Muhlfield C, Geiser M., Kapp N., Gehr P. and Rothen-Rutishauser B. (2007) Re-evaluation of pulmonary titanium dioxide nanoparticles distribution using the "relative deposition index": Evidence for clearance through microvasculature. *Particle and Fibre Toxicology.* **4**: 1-8
 - 12) 古澤邦夫 (2004) ゼータ電位の測定, *ぶんせき* **5**: 247-254
 - 13) Warheit D. B., Webb T. R., Reed K. L., Frerichs S. and Sayes C. M. (2007) Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology.* **230**: 90-104
 - 14) Atherton J. (2009) Renal blood flow, glomerular filtration and plasma clearance. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine.* **10**: 271-275
 - 15) Lin W., Huang Y., Zhou X. and Ma Y. (2006) In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology.* **217**: 252-259
 - 16) Yoshioka Y. (2011) Nanosafety Studies of Nanomaterials about Biodistribution and Immunotoxicity. *Yakugaku Zasshi.* **131**: 221-224
 - 17) Xie G., Sun J., Zhong G., Shi L. and Zhang D. (2010) Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice. *Archives of Toxicology.* **84**: 183-190
 - 18) He X., Nie H., Wang K., Tan W., Wu X. and Zhang P. (2008) In Vivo Study of biodistribution and urinary excretion of surface-modified silica nanoparticles. *Analytical Chemistry.* **80**: 9597-9603
 - 19) Stober W. and Fink A. (1968) Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science.* **26**: 62-69
 - 20) Aizawa H., Takagi T., Hirayama Y. and Ohkubo M. (2008) Development of Silica Nanoparticles for Diagnostic Testing. *Furukawa electric review.* **121**: 17-21
 - 21) Miyoshi H., Kazumori Y. and Nakayama S. (2010) Preparation of ³H-ATP-incorporated silica nanoparticles and its diffusive release. *Journal of Non-Crystalline Solids.* **356**: 2889-2895
 - 22) Brown R., Delp M., Lindstedt S., Rhomberg L. and Beliles R. (1997) Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicology and Industrial Health* **13**:

407-484

- 23) Davies B. and Morris T. (1993) Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans. *Pharmaceutical Research*. **10**: 1093-1095
- 24) Sue I., Cam D., Kahraman M., Baysal A. and Culha M. (2010) Interaction of multi-functional silver nanoparticles with living cells. *Nanotechnology*. **21**: 1-10
- 25) De Paoli Lacerda S. H., Park J. J., Meuse C., Pristinski D., Becker M. L., Karim A. and Douglas J. F. (2010) Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. *ACS Nano*. **4**: 365-379
- 26) Oberdorster G. Oberdorster E. and Oberdorster J. (2005) Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of ultrafine Particles. *Environmental Health Perspective*. **113**: 823-837
- 27) Weissleder R., Kelly K., Sun E. Y., Shtatland T. and Josephson L. (2005) Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature Biotechnology*. **23**: 1418-1423
- 28) Heckel K., Kieffmann R., Dorger M., Stoeckelhuber M. and Goetz A. (2004) Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. *American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology*. **287**: L867-L878
- 29) Renwick L. C., Donaldson K. and Clouter A. (2001) Impairment of Alveolar Macrophage Phagocytosis by Ultrafine Particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **172**: 119-127
- 30) Sadauskas E., Wallin H., Stoltenberg M., Vogel U., Doering P., Larsen A. and Danscher G. (2001) Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Particle and Fibre Toxicology*. **4**: 1-7
- 31) Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kananishi S., Sueki K., Nakahara H., Enomoto S. and Ambe F. (1995) In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene - C-14 labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chemistry and Biology*. **2**: 385-389
- 32) Cagle D., Kennel S., Mirzadeh S., Alford J. and Wilson L. (1999) In vivo studies of fullerene-based materials using endohedral metallofullerene radiotracers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**: 5182-5187
- 33) Burns A. A., Vider J., Ow H., Herz E., Penate-Medina O., Baumgart M., Larson S. M., Weisner U. and Bradbury M. (2009) Fluorescent Silica Nanoparticles with Efficient Urinary Excretion for Nanomedicine. *Nanoletters*. **9**: 442-448
- 34) Choi H., Liu W., Misra P., Tanaka E., Zimmer J., Ipe B., Bawendi M. and Frangioni J. (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology*. **25**: 1165-1170

-
- 35) Kreyling W., Semmler M., Erbe F., Mayer P., Takenaka S., Schulz H., Oberdorster G. and Ziesenis A. (2002) Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. **65**: 1513-1530
- 36) Singh R., Pantarotto D., Lacerda L., Pastorin G., Klumpp C., Prato M., Bianco A. and Kostarelos K. (2006) Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**: 3357-3362
- 37) L'Azou B., Jorly J., On D., Sellier E., Moisan F., Fleury-Feith J., Cambar J., Brochard P. and Ohayon-Courtes C. (2008) In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Particle and Fibre Toxicology*. **5**: 22-35
- 38) Bazile D., Ropert C., Huve P., Verrecchia T., Marlard M., Frydman A., Veillard M. and Spenlehauer G. (1992) BODY DISTRIBUTION OF FULLY BIODEGRADABLE [C-14] POLY(LACTIC ACID) NANOPARTICLES COATED WITH ALBUMIN AFTER PARENTERAL ADMINISTRATION TO RATS. *Biomaterials*. **13**: 1093-1102

第3章 ナノ粒子の嗅神経を介した嗅球への移行経路

3.1 背景

ナノ粒子の体内動態実験を行った既存の研究では、曝露されたナノ粒子が中枢神経系へ移行することを報告した^{1,2}。その移行経路として、鼻腔に侵入したナノ粒子が嗅神経内に侵入し、軸索輸送により中枢神経系へ移行することが示唆されている。しかし、実際にナノ粒子が嗅神経内に侵入し、移行する様子を捉えた報告はない。本章では、ナノ粒子の嗅神経内への侵入および嗅球への移行を、顕微鏡下でのイメージングにより検討した。はじめに、蛍光ポリスチレンナノ粒子をラットに点鼻投与し、鼻腔から嗅粘膜内への侵入を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。これにより、ナノ粒子が嗅粘膜へ沈着、侵入するかを細胞層単位で観察した。次に、金コロイドをマウスに点鼻投与し、嗅神経のシナプスが存在する嗅球の糸球体層を、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。これにより、ナノ粒子が嗅神経の軸索終末まで到達し、さらには二次ニューロンの樹状突起への侵入が見られるかを、嗅神経 1 本単位で観察した。これらの実験から、ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行経路が存在するかを検討した。

3.2 嗅覚器の神経回路

嗅覚器の神経回路は嗅粘膜と嗅球を繋ぐ嗅神経（一次ニューロン）、嗅球と前有孔質、鉤、梨状葉皮質などの一次嗅皮質を繋ぐ僧帽細胞および房飾細胞（二次ニューロン）、一次嗅皮

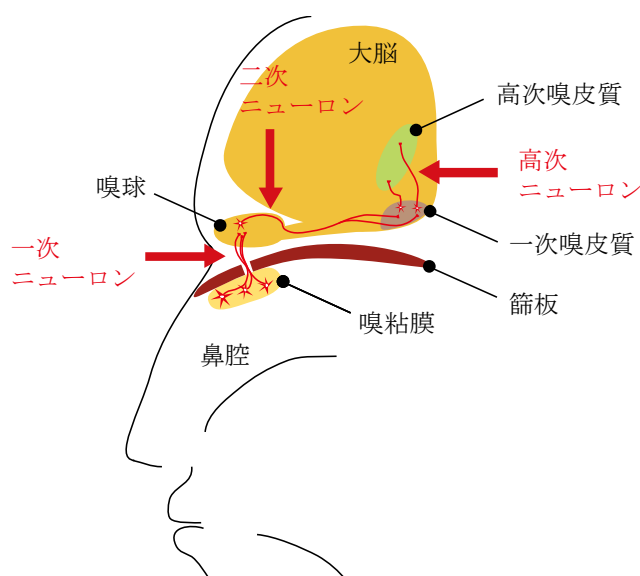


図 3-1 嗅覚の神経回路の模式図

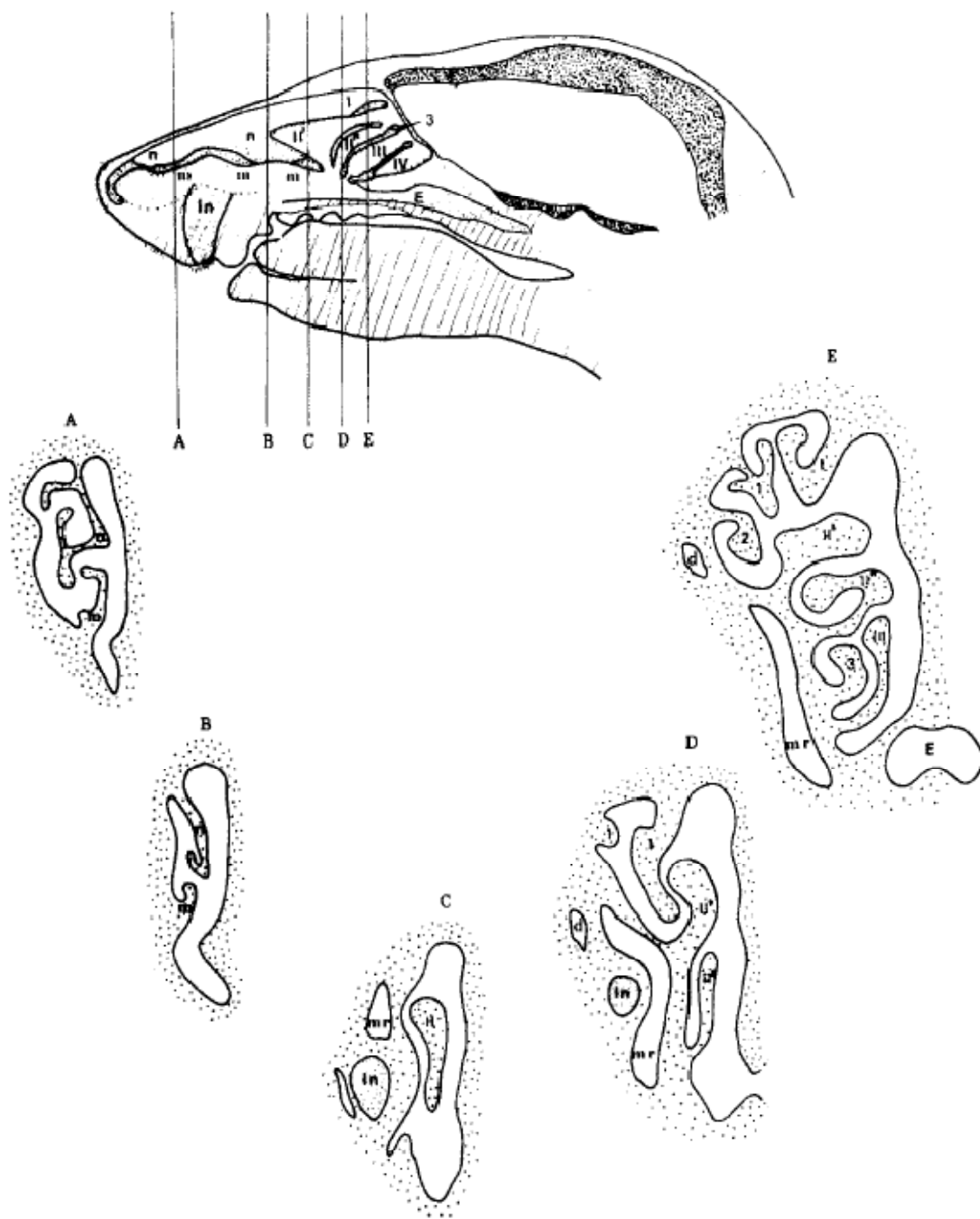


図 3-2 マウスの鼻腔の断面図 (A~E) ³

(略字) d : 鼻涙管, E : 鼻咽道, In : 切歯, m : 上顎甲介, mr : 上顎陥凹, n : 鼻甲介,
1~3 : 外鼻甲介, I~IV : 内鼻甲介

質と高次嗅皮質を繋ぐ高次ニューロンで構成されている (図 3-1)。他の感覚路と異なり、一次中枢 (嗅覚器の場合は嗅球) から視床に投射せず、大脳辺縁系の一次嗅皮質に投射する点が特徴的である。

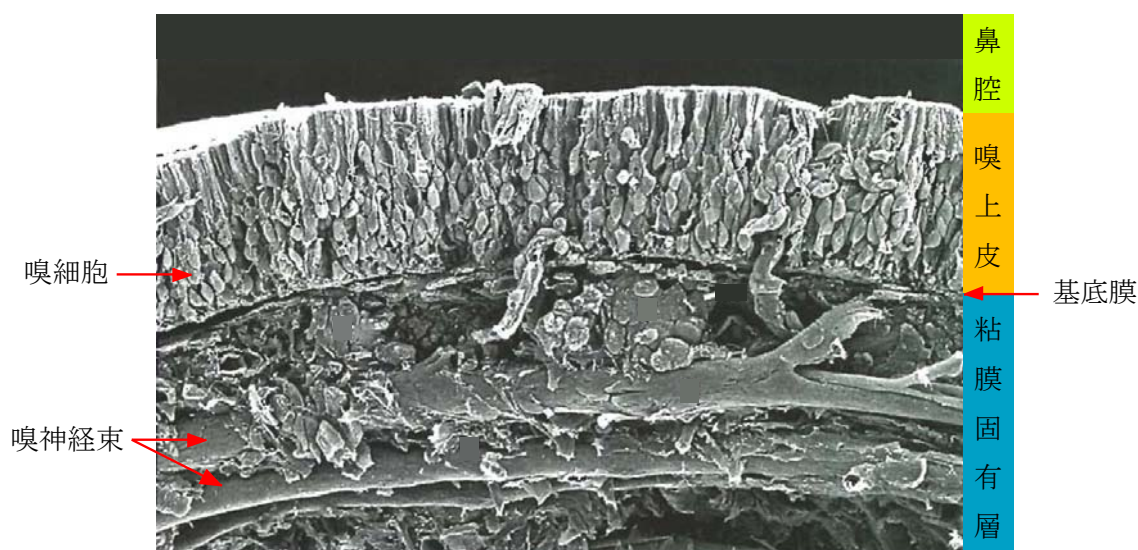


図 3-3 嗅粘膜の走査型電子顕微鏡像⁴（一部改編）

図 3-2 はマウスの鼻腔の断面図である³。鼻腔は鼻先から鼻奥にかけて次第に複雑に入り組んでいる。鼻先にある上顎甲介には嗅上皮が存在せず、呼吸上皮が覆っている。断面図 A から C にかけて、次第に嗅上皮の割合が増加する。断面図 D, E 付近では、3 つの外鼻甲介と、4 つの内鼻甲介が存在し、ほとんどが嗅上皮で覆われている。

嗅粘膜は鼻腔の後上方に位置する。その構造は基底膜より表層の嗅上皮と、下層の粘膜固有層に分けられる（図 3-3）⁴。嗅上皮は嗅細胞（嗅神経）、基底細胞、支持細胞、ボウマン腺の導管細胞により構成される。嗅細胞は嗅上皮の表面に対して垂直に伸びる双極細胞である。鼻腔表面へ向かって樹状突起を伸ばし、基底膜方向へ軸索を伸ばしている。軸索は嗅上皮内で集束し、小さな束を形成した後、基底膜を貫いて粘膜固有層に入る。粘膜固有層でさらに太い嗅神経束を形成し、篩板を貫いて嗅球へ投射する。嗅神経は無髄神経であり、シュワン細胞の細胞質によって不完全に取り囲まれて嗅神経束を形成している。

嗅神経の嗅粘膜から嗅球への投射は、同種のおい分子受容体を発現する嗅細胞の軸索収束と、ゾーンからゾーンへの投射という 2 つの特徴を持つ。ゾーンとは、齧歯類の複雑な鼻腔域を分子生物学的に区別化した領域を示し、嗅粘膜は I～IV の 4 つのゾーンに分かれている。Buck らは、特定のおい分子受容体を発現する嗅細胞は嗅上皮の特定ゾーン内でランダムに分布しているが、その軸索は収束し、空間的に固定された特定の糸球体へ選択的に投射することを見出した^{5,6}。におい分子受容体の発現パターンによって規定されるゾーン構造に注目すると、嗅球における糸球体の空間配置の中にも対応するゾーン構造が見出される。嗅上皮の最背内側に位置するゾーン I の嗅細胞は嗅球の最背内側にゾーン状に配置される糸球体群に選択的に投射している。同様に、ゾーン II, III, IV の嗅細胞はそれぞれ対応する嗅球のゾーン II, III, IV へと投射している（Zone-to-zone projection）。図 3-4 は、ゾーン I の嗅神経の Zone-to-zone projection を表している。ゾーン I に存在する同種のおい

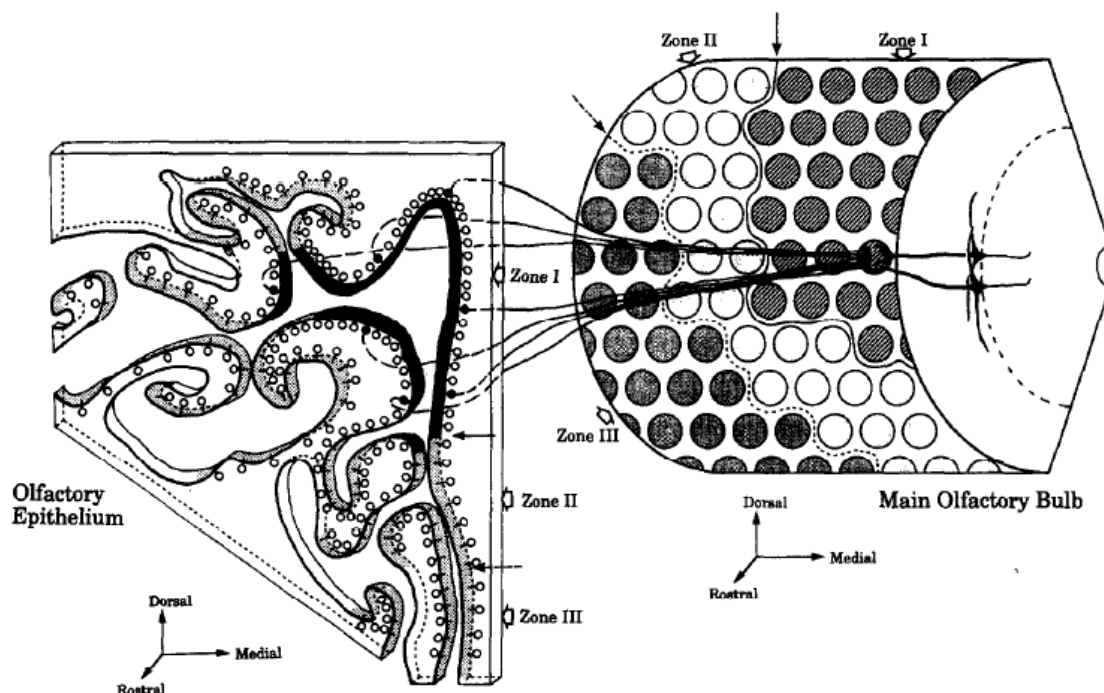


図 3-4 嗅神経のZone-to-zone projection⁷

い分子受容体を発現する嗅細胞が集まって嗅神経束を形成し、一つの糸球体へと投射されることが確認できる⁷。特定のにおい分子受容体を発現する嗅細胞の標的糸球体は嗅球内外側に一対あるが、嗅球全体として見たときには内外側に鏡像対照的に配置されている⁵。個々の糸球体の空間配置は、嗅球のにおい分子受容体図と見ることができ、嗅球は内外側に鏡像対照的なにおい分子受容体地図を構成していると言える。

嗅球は嗅神経層、糸球体層、外叢状層、僧帽細胞層、内叢状層、顆粒細胞層の6層で構成される(図 3-5)⁸。嗅細胞の軸索終末は糸球体層に投射し、僧帽細胞および房飾細胞の樹状突起とシナプスを構成する。外叢状層には房飾細胞の細胞体が存在する。また、僧帽細胞層には僧帽細胞の細胞体が存在し、薄い層を形成している。僧帽細胞と房飾細胞の樹状突起は2種類に分けられる。径の太い一次樹状突起は突起を糸球体層まで伸ばし、一次ニューロンの軸索とシナプスを形成するのに対して、径の細い二次樹状突起は外叢状層において顆粒細胞の樹状突起とシナプスを形成する。

僧帽細胞、房飾細胞の軸索は嗅索を形成して嗅球から嗅三角に至り、そこで内側嗅条、外側嗅条に分かれる。嗅索の大部分は外側嗅条となって前有孔質、鉤、梨状葉皮質などの一次嗅皮質に投射する。においの情報は一次嗅皮質で処理された後、傍梨状核、扁桃体、内嗅皮質、視床背内側核などの高次嗅皮質へ投射する。また、嗅索の中には扁桃体や嗅内野へ直接投射する繊維も存在する。

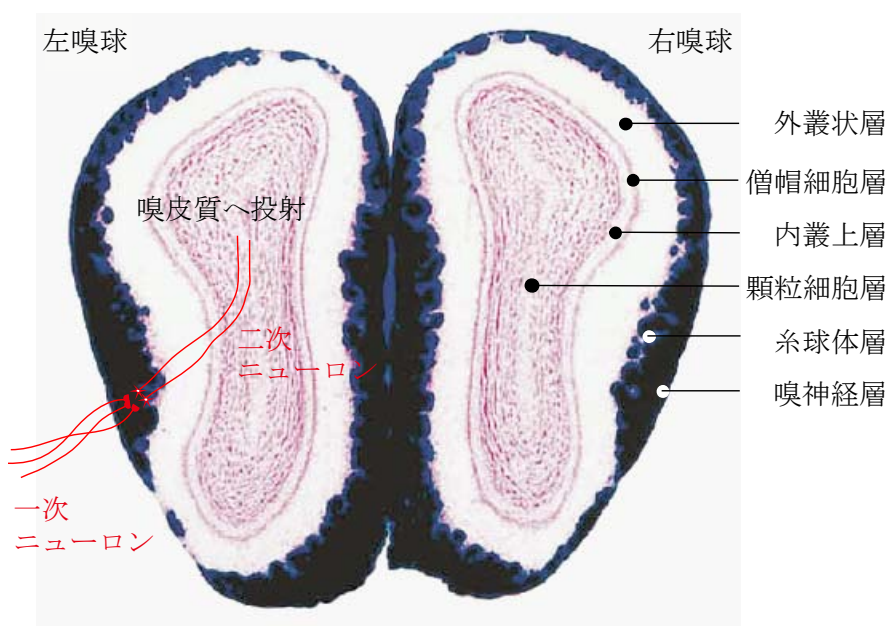


図 3-5 嗅球の構造⁸（一部改編）

3.3 蛍光ポリスチレンナノ粒子を点鼻投与したラットにおけるナノ粒子の観察

3.3.1 はじめに

曝露したナノ粒子が嗅神経を介して中枢神経系へ移行することは、多くの研究で示唆されている。Elderらは、酸化マンガンナノ粒子（粒径 30 nm）をラットに曝露したところ、曝露群の嗅球で、対照群よりもマンガン濃度が約 2.5 倍増加した。さらに、右鼻を覆って曝露したところ、右鼻の嗅球では対照群と比べてマンガン量はほぼ変わらなかったが、左鼻の嗅球ではマンガン量が増加した²。Oberdorsterらは、¹³Cナノ粒子（粒径 36 nm）をラットに経気道曝露し、トレーサー実験を行った。その結果、粒子の多くは肺に移行するが、時間の経過と共に嗅球での増加が観察された。一方、実際にナノ粒子が嗅神経に侵入し、中枢神経系へ移行する様子を捉えた報告はなく、その移行経路は未だ解明されていない。また、中枢神経系での曝露粒子由来の値の増加が曝露したナノ粒子であるか、溶解したイオンであるかを判断することができない。これらを解決するためには、非溶解性のナノ粒子を曝露した嗅神経を顕微鏡下で観察し、嗅神経内への侵入および中枢神経系への移行を実証する必要がある。

この移行経路を解明するため、著者らは共焦点レーザー顕微鏡を用いた嗅神経のイメージングにより、ナノ粒子の嗅神経への侵入を検討した。粒径の異なる 2 種類の蛍光ポリマー粒子を、マウス（BALB/c）の片鼻に点鼻投与した。粒径 15 nm の蛍光ポリマーナノ粒子（個数濃度 5.5×10^{15} particles/mL, 励起波長 552 nm, Micromod 社製）と、粒径 250 nm の蛍光ポリマー粒子（個数濃度 3.0×10^{12} particles/mL, 励起波長 320 nm, Micromod 社製）を混合

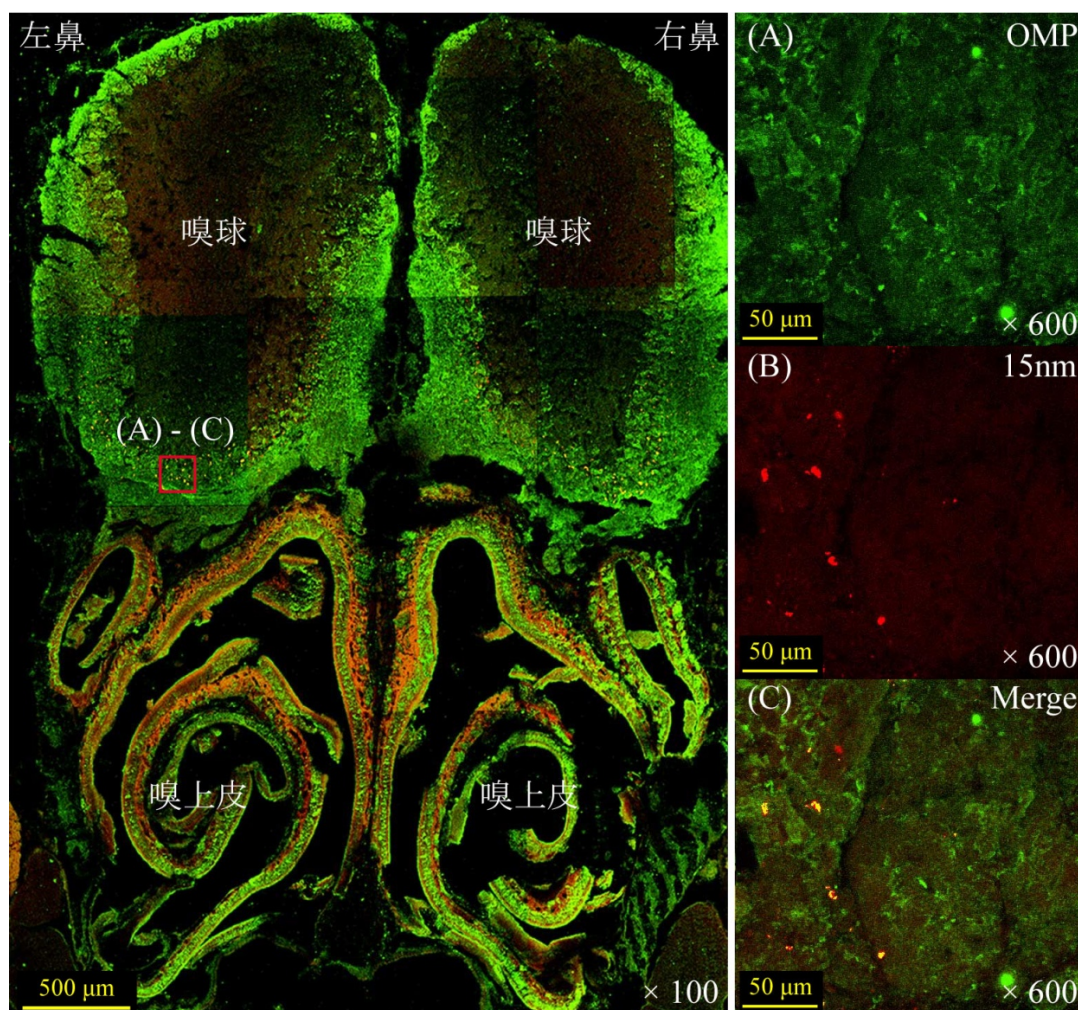


図 3-6 蛍光ポリマー粒子（粒径 15 nm, 250 nm）混合液を点鼻投与したマウスにおける
投与 24 時間後の嗅覚切片の共焦点レーザー顕微鏡像
（左図）：全体像（倍率 100 倍），（右図）：左図赤枠内の拡大像（倍率 600 倍）
（A）：OMP 染色画像，（B）：蛍光ポリマーナノ粒子（15 nm）像，
（C）：図（A）と（B）の重ね合わせ像

した懸濁液を投与液とした。投与 24 時間後にマウスを解剖し，作成した嗅覚切片を共焦点レーザー顕微鏡（FV300，オリンパス社製）にて観察した。図 3-6 は赤色レーザー（波長 580 nm）で 15 nm 粒子を励起させて観察した嗅覚切片である。嗅神経の標識タンパク質（OMP）を用いた免疫染色により，嗅神経が緑色に標識されている。嗅細胞の細胞体が存在する嗅上皮では，15 nm 粒子が一様に侵入している様子が観察された。また，嗅球の糸球体層においても，図 3-6 の拡大像（B）が示す通り，15 nm 粒子が点在していた。一方，青色レーザー（波長 360 nm）で 250 nm 粒子を励起させて観察したところ，250 nm 粒子は嗅上皮への侵入は認められたが，嗅球への移行は観察されなかった。この結果から，ナノ粒子が嗅神経に侵入後，嗅球へ移行することが確認された。

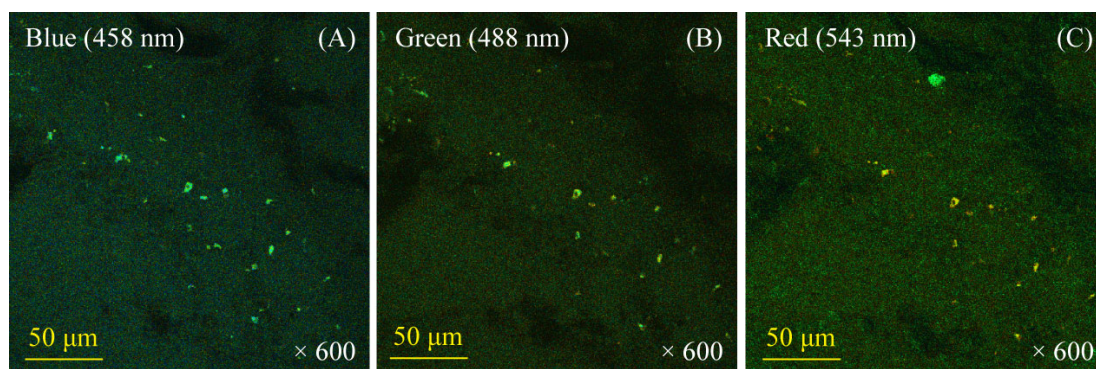


図 3-7 嗅球の糸球体層に存在する自家蛍光

(A)：青色レーザー（波長 458 nm）による蛍光画像，(B)：緑色レーザー（波長 488 nm）による蛍光画像，(C)：赤色レーザー（波長 543 nm）による蛍光画像

しかし、BALB/c の嗅球には自家蛍光と呼ばれる生体組織由来の蛍光が強く観察される場合もある。図 3-7 は嗅球の糸球体層を 3 種類の異なる励起波長のレーザーで観察した画像である。どの画像中にも共通して存在するスポットが存在することが分かる。すなわち、このスポットは蛍光粒子由来ではなく嗅球由来の自家蛍光である可能性が高い。この結果から、嗅球に存在するスポットのいくつかは自家蛍光によるものと考えられる。したがって、既存の研究成果では嗅神経へのナノ粒子の侵入を明確に示すことができていない。この課題を解決するには、自家蛍光の少ない動物種を用いて蛍光粒子を投与し、嗅神経内で蛍光が存在することを明示する必要がある。

そこで本実験では、Sprague-Dawley ラットを用いて蛍光ポリスチレンナノ粒子の点鼻投与を行った。未投与の Sprague-Dawley ラットの嗅球を観察した結果、自家蛍光が確認できなかったため、投与動物に選定した。したがって、投与後のラットの嗅覚切片から励起された蛍光が確認されれば、蛍光ポリスチレンナノ粒子由来の蛍光であると言える。また、投与した蛍光ポリスチレンナノ粒子は、透過光でも蛍光を観察できるほど輝度の高い粒子である。これにより、粒子の存在をある程度肉眼で観察することができ、より正確に粒子の局在を確認することができる。

点鼻投与は単回投与と複数回投与の 2 種類を行った。単回投与では、投与量が最大でも 20～30 μL が限界であることや、鼻腔に入ったナノ粒子のいくらかはそのまま吸引されて気管や食道へ排出されるため、嗅神経への沈着量が限られる。そこで、複数回投与することにより投与量を増やし、嗅神経に侵入したナノ粒子をより確実に検出することを目的とした。点鼻投与後、嗅粘膜と嗅球を共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、ナノ粒子の嗅神経への侵入および嗅球への移行を検討した。

3.3.2 実験方法

本実験では、Sprague-Dawley ラット（雄，7 週齢）を 4 匹用いた。実験群は単回投与群（n

= 2) と複数回投与群 (n = 2) の2群とした。単回投与群のラットは、ネンブタール注射液 (5 mg /mL) を腹腔内に 350 μ L 投与して麻酔をかけた後、蛍光ポリスチレンナノ粒子 (粒径 40 nm, 個数濃度 1.1×10^{15} particles/mL, 励起波長 540 nm, Molecular Probes社製) を、マイクロピペットで左鼻に 10 μ L 点鼻投与した。複数回投与群のラットは、ネンブタール麻酔後、マイクロピペットで左鼻に各回 10 μ L ずつ、連続的に計 4 回投与した。投与した液が完全に鼻腔内に吸い込まれたのを確認した後、次の 10 μ L を投与した。1 回目の投与から 10 分以内に、計 4 回の投与を完了した。単回投与群は投与から 8 時間後、複数回投与群は投与から 24 時間後に灌流固定を行った。ネンブタール注射液で麻酔をかけ、0.2% ヘパリン含有生理食塩水を右心房より注入し、約 15 分間灌流した。これにより、血液中に存在する粒子を取り除いた。その後、4% パラホルムアルデヒド溶液にて約 20 分間固定した。灌流固定後、30 分間室温にて静置して組織を固定し、断頭して皮膚を剥いだ頭部を、4% パラホルムアルデヒド溶液中で 2 日間浸漬固定した。その後、25% スクロース溶液に入れ、3 日間浸透させた。浸透後、試料をステンレス製包埋容器に入れ、容器内を凍結組織包埋剤 (O.C.T. Compound, Tissue-Tek 社製) で満たしたものを、ドライアイスで冷却したヘキサン (-75°C) 中に入れて凍結させた。凍結後の試料をクライオスタット (CM3050S, Leica 社製) にセットし、厚さ 30 μ m で鼻先から鼻奥にかけて連続的に切片を切り出した。切り出した切片は、川本法に基づいて凍結切片用シール (Cryofilm Type II, FINETEC 社製) に貼り付けた⁹。図 3-2 で示した鼻腔の断面図 A から E までの嗅粘膜が存在する切片と、E の後から現れる嗅球の切片を観察用の切片とし、凍結切片用シールに貼り付けた。切片が貼り付いたシールをスライドグラス上で固定し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV300, オリンパス社製) にて観察した。透過光での観察と赤色レーザー (波長 580 nm) での観察を行い、それらの像を重ね合わせて粒子の局在部位を検討した。

3.3.3 結果

図 3-8 は蛍光ポリスチレンナノ粒子 (粒径 40 nm) を単回点鼻投与したラットにおける投与 8 時間後の嗅覚切片である。図 (A) ~ (C) は、透過光での観察像と赤色レーザーでの観察像を重ね合わせた図である。(A) の画像は、スライドグラスを少しずつずらしながら組織全体を撮像し、それらの像を結合して全体像として表した図である。鼻腔の形状から、この切片は図 3-2 で示した鼻腔の断面図 B 付近の部位である。図 3-8 (A) の下側を見ると、左鼻の鼻腔および組織内で蛍光が確認された。一方、右鼻では蛍光が確認できないため、この蛍光は蛍光ポリスチレンナノ粒子由来であると言える。そのほとんどは鼻腔内で滞留しているが、一部は組織内に侵入していることが確認された。この部位は嗅上皮が存在せず、呼吸上皮が占めている部分である¹⁰。また、図 (A) の上側にも嗅上皮の表面に蛍光ポリスチレンナノ粒子由来の蛍光が確認された。図 (B) と (C) は、蛍光ポリスチレンナノ粒子が確認された部分を拡大して示した像である。(B) の部位は嗅上皮が存在する部位、(C) は呼吸上皮が存在する部位である¹⁰。これらの画像より、蛍光ポリスチレンナノ粒子が嗅上

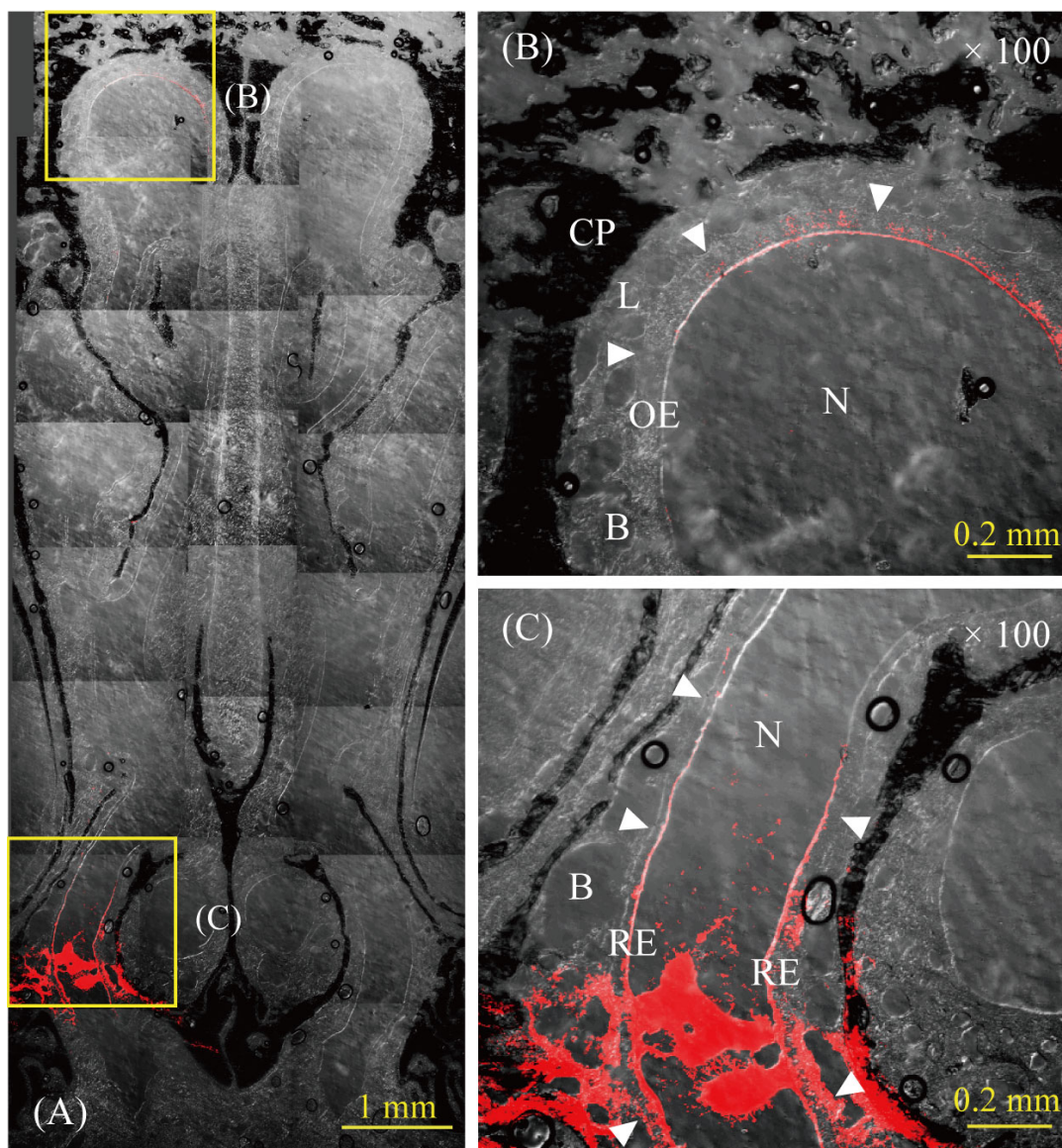


図 3-8 蛍光ポリスチレンナノ粒子（粒径 40 nm）を単回点鼻投与したラットにおける投与 8 時間後の嗅覚切片の共焦点レーザー顕微鏡像

(A)：切片の全体像，(B)：嗅粘膜の拡大像（倍率 100 倍），(C)：呼吸上皮の拡大像（倍率 100 倍）（略字）N：鼻腔，OE：嗅上皮，RE：呼吸上皮，B：毛細血管，L：粘膜固有層，CP：篩板，白矢じり：基底膜

皮および呼吸上皮内に侵入していることが確認された。

図 3-9 は図 3-8 (B) の部位を高倍率で観察した像である。(A) の画像は、左鼻の嗅粘膜と右鼻の嗅粘膜の一部を表した図である。左鼻の嗅粘膜には蛍光が広く分布しているが、右鼻の嗅粘膜には蛍光は確認できない。したがって、この蛍光は左鼻に投与した蛍光ポリスチレンナノ粒子が嗅粘膜へ侵入していると言える。(B) と (C) の画像は、蛍光が確認さ

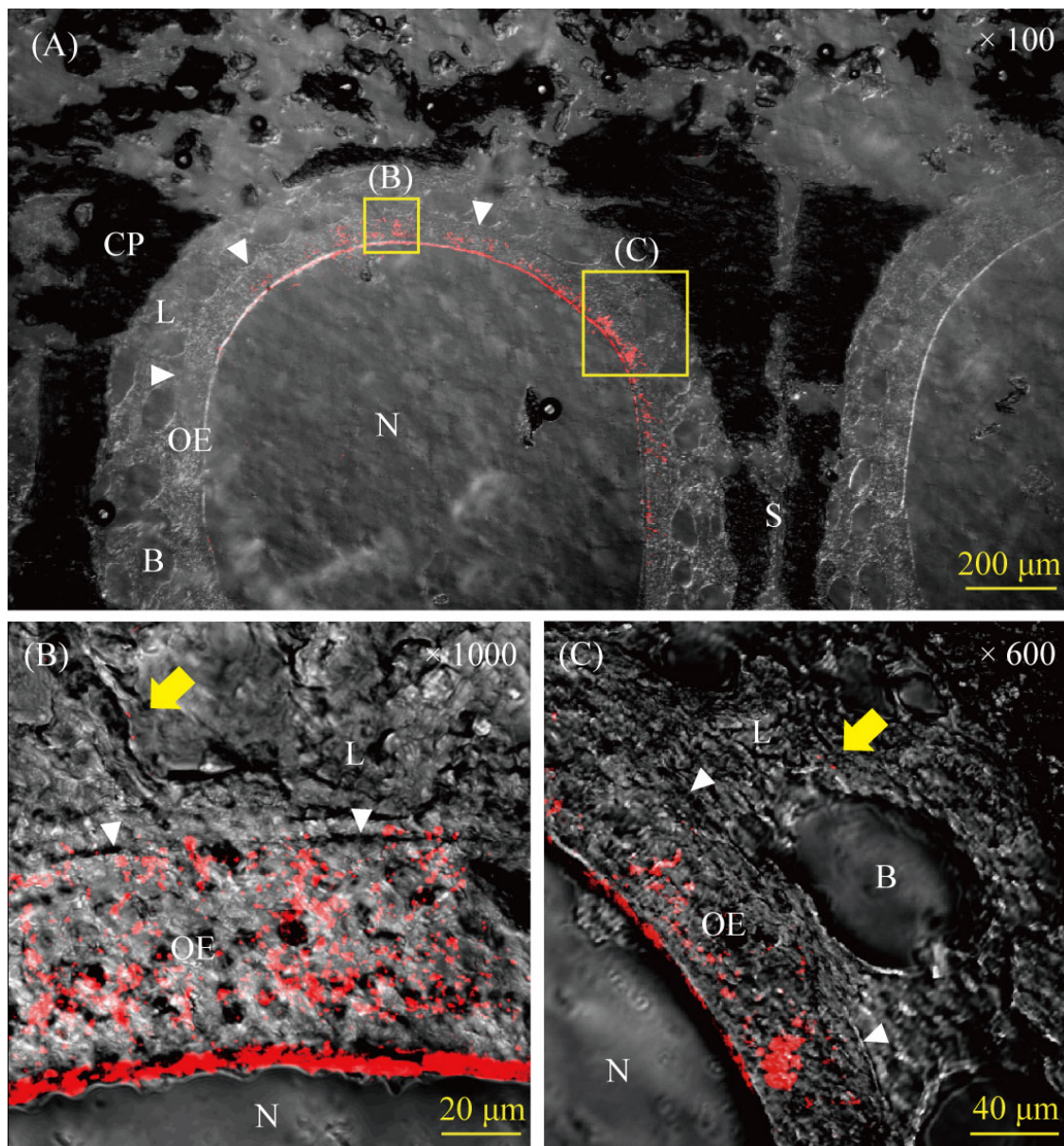


図 3-9 蛍光ポリスチレンナノ粒子（粒径 40 nm）を単回点鼻投与したラットにおける投与 8 時間後の嗅粘膜の共焦点レーザー顕微鏡像

(A)：低倍率像（倍率 100 倍），(B)：嗅粘膜の拡大像（倍率 1000 倍），
(C)：嗅粘膜の拡大像（倍率 600 倍） （略字）N：鼻腔，OE：嗅上皮，
B：毛細血管，L：粘膜固有層，CP：篩板，白矢じり：基底膜

れた部位を拡大して観察した図である。本実験では、自家蛍光やバックグラウンドの影響を考慮し、免疫染色を行わなかったため、個々の嗅細胞を確認することはできない。しかし、観察像のコントラストから基底膜を判断することができ、それを境に嗅上皮と粘膜固有層を確認することができる。また、粘膜固有層に存在する大きな空洞が毛細血管、嗅粘

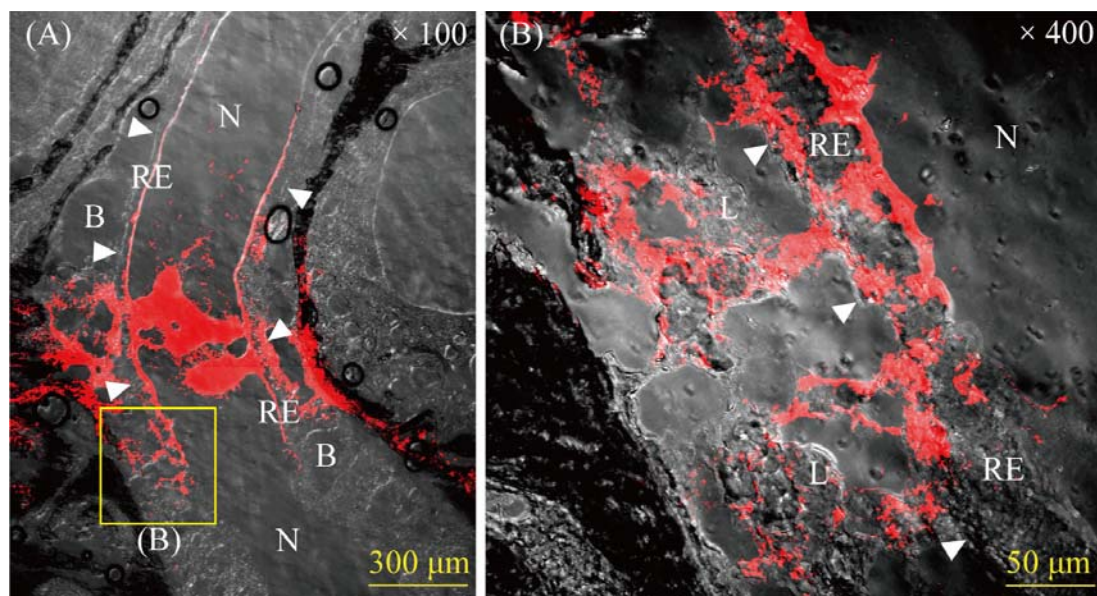


図 3-10 蛍光ポリスチレンナノ粒子（粒径 40 nm）を単回点鼻投与したラットにおける投与 8 時間後の呼吸上皮の共焦点レーザー顕微鏡像

(A)：低倍率像（倍率 100 倍），(B)：呼吸上皮の拡大像（倍率 400 倍）

（略字）N：鼻腔，OE：嗅上皮，B：毛細血管，L：粘膜固有層，白矢じり：基底膜

膜を取り囲むように存在する黒色の物質が篩板であることも判断できる。これらの拡大像から、蛍光ポリスチレンナノ粒子が嗅上皮の表面に沈着し、さらには嗅上皮内に侵入していることが確認された。一方、基底膜を境に、粘膜固有層ではほぼ蛍光が観察されず、黄矢印が示す部位でわずかに確認された。

図 3-10 は図 3-8 (C) の部位を高倍率で観察した像である。(A) の画像から、鼻腔で蛍光が確認された。右鼻にはこのような蛍光が確認できないため、これは蛍光ポリスチレンナノ粒子由来の蛍光であると言える。また、蛍光ポリスチレンナノ粒子が鼻腔に滞留している部位の両側に存在する呼吸上皮および粘膜固有層で、蛍光が確認された。さらに、粘膜固有層の奥側に存在する篩板でも、蛍光が確認された。さらに、図 (B) から蛍光ポリスチレンナノ粒子が呼吸上皮の表面に沈着し、呼吸上皮内に侵入していることが確認された。また、図 3-9 で示した嗅粘膜とは異なり、基底膜を越えて粘膜固有層へも多く侵入していることが確認された。図 3-10 (B) の画像と同様の結果は、図 3-2 で示した鼻腔の断面図 B 付近の切片でも得られた。一方で、図 3-2 の鼻腔の断面図 A, C, D, E 付近の切片では、鼻腔、呼吸上皮、嗅粘膜ともに蛍光は確認されなかった。また、嗅球の切片でも蛍光は確認されなかった。

図 3-11 は蛍光ポリスチレンナノ粒子（粒径 40 nm）を複数回点鼻投与したラットの投与 24 時間後の嗅覚切片である。切片の部位は図 3-8 とほぼ同じ部位である。(A) の画像から、左鼻の鼻腔および呼吸上皮で蛍光が確認された。一方、右鼻からは蛍光が確認できない

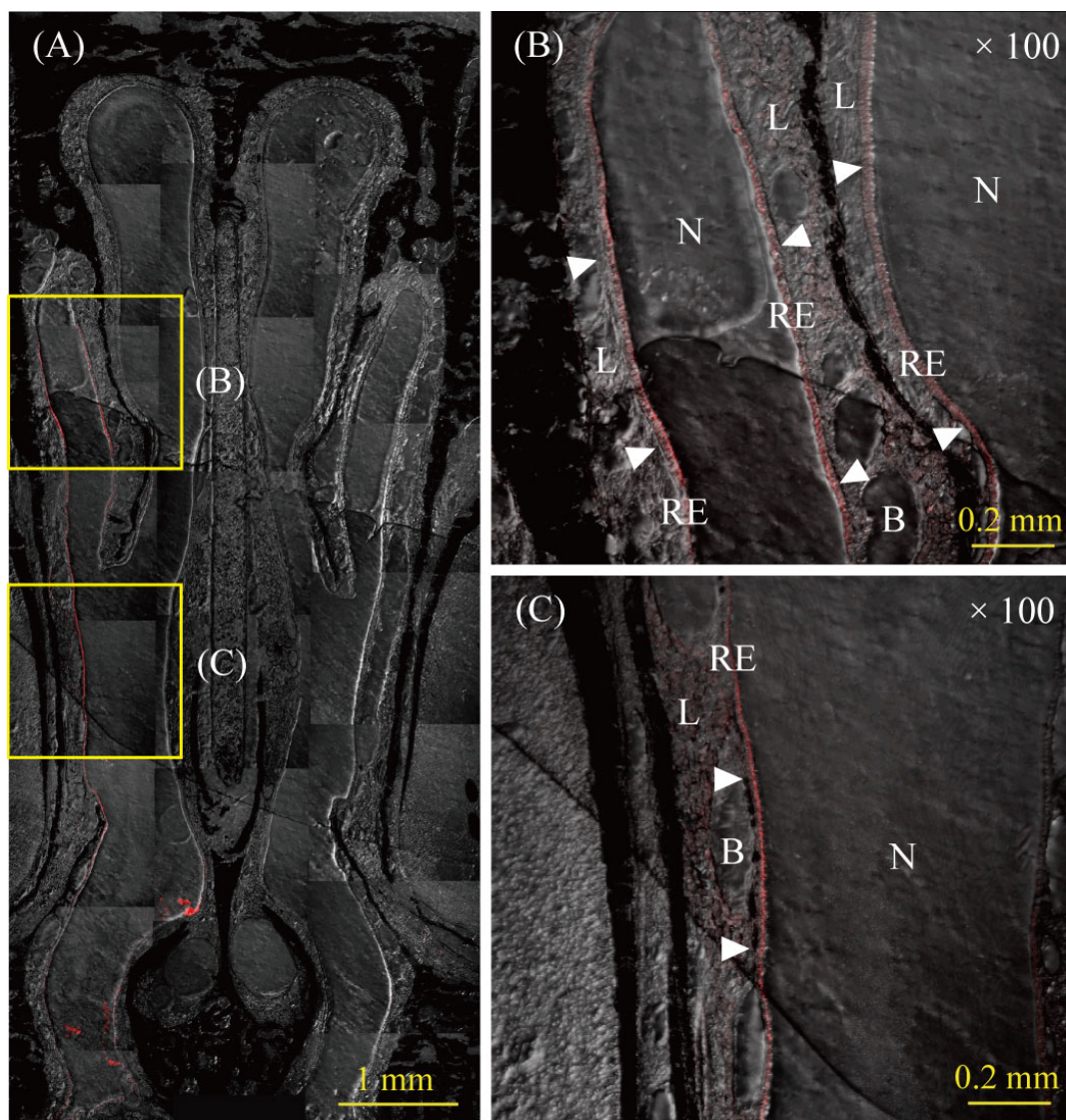


図 3-11 蛍光ポリスチレンナノ粒子（粒径 40 nm）を複数回点鼻投与したラットにおける投与 24 時間後の嗅覚切片の共焦点レーザー顕微鏡像

(A)：切片の全体像，(B)：呼吸上皮上部の拡大像（倍率 100 倍），

(C)：呼吸上皮中央部の拡大像（倍率 100 倍）（略字）N：鼻腔，OE：嗅上皮，

B：毛細血管，L：粘膜固有層，白矢じり：基底膜

め、左鼻に存在する蛍光は蛍光ポリスチレンナノ粒子由来であると言える。図 (B) および (C) の拡大画像から、蛍光ポリスチレンナノ粒子が呼吸上皮に一様に沈着していることが確認された。また、基底膜を境に粘膜固有層ではわずかに蛍光が確認された。一方、嗅粘膜では蛍光が確認されなかった。また、単回投与群と同様に、図 3-2 で示した鼻腔の断面図 A, C, D, E 付近の切片および嗅球の切片では、蛍光は確認されなかった。

3.3.4 考察

本実験では、輝度が非常に高い蛍光ポリスチレンナノ粒子を使用した。これにより、励起するレーザーの強度が低くても十分に粒子由来の蛍光を捉えることができ、バックグラウンド由来の蛍光を最小限に抑えることができた。また、透過光でも粒子の蛍光を観察することができ、ある程度粒子の局在を確認した後で、レーザー照射下での観察をすることができた。さらに、未投与の Sprague-Dawley ラットの嗅球では自家蛍光が確認できなかった。これらの根拠から、観察された蛍光が蛍光ポリスチレンナノ粒子由来の蛍光であると言える。

蛍光ポリスチレンナノ粒子の単回投与群では、鼻腔、呼吸上皮、嗅粘膜で蛍光が確認された。また嗅粘膜では、その表面と嗅上皮において蛍光が確認された。これらの結果から、嗅粘膜へ蛍光ポリスチレンナノ粒子が侵入したと考えられる。しかし、嗅上皮は嗅細胞だけでなく、基底細胞、支持細胞、ボウマン腺の導管細胞により構成されているため、嗅上皮で確認された蛍光は嗅細胞へ侵入しているのか、その他の細胞や細胞間の間隙に存在しているのかは判断できない。これを確かめるには、TEM を用いた嗅細胞を1本ずつ観察していくことが必要となる。

粘膜固有層では、蛍光がスポット上に所々観察された。この結果は、嗅神経に侵入した蛍光ポリスチレンナノ粒子が軸索輸送により嗅球へ移行することを示唆している。しかし、嗅球からは蛍光が確認されなかった。De Lorenzoの報告では、投与から1時間後に鼻腔に投与した金ナノ粒子（粒径 50 nm）が嗅球で確認された¹¹。したがって、嗅神経に蛍光ポリスチレンナノ粒子が侵入した場合、投与から8時間後には嗅球へ到達していると推測される。嗅球で蛍光が観察されなかった理由として、投与した蛍光ポリスチレンナノ粒子は嗅球へ到達したものの、その数は少なく、共焦点レーザー顕微鏡では検出できなかった可能性がある。実際、嗅粘膜が多くを占める図3-2で示した鼻腔の断面図C, D, E付近で、蛍光ポリスチレンナノ粒子が確認されなかったことから、嗅粘膜で確認された蛍光ポリスチレンナノ粒子は、嗅粘膜全体から見ればほんのわずかにすぎない。これは、鼻腔でのナノ粒子の滞留性が関与していると考えられる。嗅粘膜、呼吸上皮で蛍光ポリスチレンナノ粒子の沈着、侵入が観察された切片では、鼻腔でも蛍光ポリスチレンナノ粒子の滞留が観察された。すなわち、鼻腔に長く滞留することで、上皮へ沈着する確率が上がり、肉眼で確認できるほど多くの蛍光ポリスチレンナノ粒子が上皮内に侵入したものと考えられる。本実験で使用する全てのラット（n = 4）から、鼻腔のほぼ同じ部位に蛍光ポリスチレンナノ粒子が滞留していたため、鼻腔の構造上この部位に粒子が溜まりやすいことが考えられる。

本実験では、蛍光ポリスチレンナノ粒子の懸濁液を投与したため、鼻腔に投与した粒子は液中に存在する。実環境では大気中に飛散するナノ粒子に曝露されるケースが多いと考えられるが、飛散したナノ粒子と液中に存在するナノ粒子では鼻腔に侵入した際の挙動が異なる可能性がある。したがって、飛散した蛍光ポリスチレンナノ粒子を曝露した場合、鼻腔全体に拡散し、嗅粘膜全体へ沈着および侵入する可能性がある。今後の課題として、

吸入曝露やスプレー噴射により蛍光ポリスチレンナノ粒子を曝露し、その嗅粘膜を観察して沈着部位を確認することが必要となる。

複数回投与の切片では、鼻腔中に滞留している蛍光ポリスチレンナノ粒子の量が減少した。本実験では、単回投与のラットは8時間後に解剖し、複数回投与のラットは24時間後に解剖した。したがって、鼻腔に滞留していた蛍光ポリスチレンナノ粒子は次第に気管や食道へ排出されたものと考えられる。また、単回投与に見られた蛍光ポリスチレンナノ粒子の嗅粘膜への沈着、侵入は観察されず、呼吸上皮でも粘膜固有層ではほとんど蛍光が確認されなかった。鼻腔に侵入した異物は、上皮表面の粘膜層による粘液纖毛クリアランスにより、鼻咽頭へと除去される。また、粘膜固有層には毛細血管や鼻腺が存在するため、血流やリンパに乗って次第に粘膜固有層から拡散する。したがって、鼻腔内に侵入した蛍光ポリスチレンナノ粒子にも同様の物理的な防御機構が働き、徐々に鼻腔内から排出された可能性が考えられる。

一方、呼吸上皮への沈着は、単回投与よりも広い領域で沈着、侵入が認められた。複数回投与により投与量が増えたことで、鼻腔内の広い範囲に粒子が行き渡ったためと考えられる。しかし、嗅粘膜では蛍光ポリスチレンナノ粒子が確認されず、鼻腔内の粒子の挙動は依然として未解明な部分が多い。ただ、本結果よりナノ粒子が嗅粘膜に沈着し、嗅神経へ侵入する可能性があることを解明した。これは実環境に存在するナノ粒子も、鼻腔に侵入後に嗅粘膜へ沈着することを示唆している。また、既存の研究で示されてきたナノ粒子の中樞神経系への移行が、嗅神経を介して移行している可能性を裏付ける結果となった。

3.4 金コロイドを点鼻投与したマウスの嗅球におけるナノ粒子の観察

3.4.1 はじめに

蛍光ポリスチレンナノ粒子の点鼻投与実験より、嗅粘膜で蛍光が確認され、ナノ粒子が嗅粘膜へ侵入することを確認した。しかし、嗅球では蛍光が確認されなかった。粘膜固有層では蛍光が所々確認されたことから、嗅球へ蛍光ポリスチレンナノ粒子が移行している可能性はある。また、嗅神経へのナノ粒子の侵入を決定づけるためには、嗅神経1本単位で観察し、その中にナノ粒子が存在する画像を捉えるしか方法がない。これらの課題を解決するには、嗅神経の軸索が投射される嗅球の糸球体層を、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて嗅神経1本単位で観察し、ナノ粒子の存在を確認する必要がある。それと同時に、軸索終末まで到達したナノ粒子が、糸球体層に存在する二次ニューロンの樹状突起へ侵入することが確認できれば、嗅神経を介したナノ粒子の中樞神経系への移行経路が存在することを解明することができる。

著者らは、金コロイド（粒径5 nm、シグマ社製）をマウスの左鼻に点鼻投与し、投与24時間後に解剖した嗅球の糸球体層を、走査透過型電子顕微鏡（STEM）を用いて観察した（図

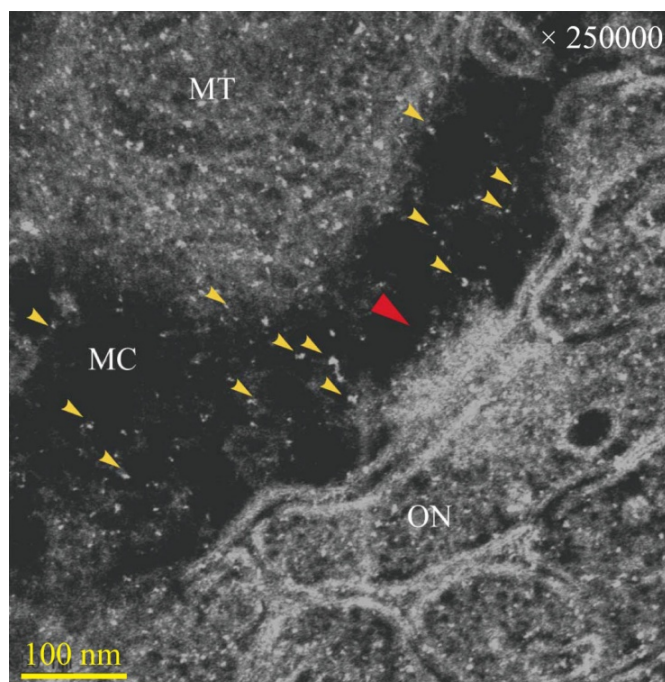


図 3-12 金コロイド（粒径 5 nm）を点鼻投与したマウスにおける投与 24 時間後に解剖した嗅球の糸球体層の走査透過電子顕微鏡像（倍率 25 万倍）
（略字）ON：嗅神経，MC：僧帽細胞，MT：ミトコンドリア，
黄矢印：金コロイド，赤矢印：嗅神経と僧帽細胞とのシナプス

3-12)。金コロイドは電子密度が高いため、TEM では濃い黒色の物質として観察される。STEM では白黒が反転するため、金コロイドは白色に映る。そのコントラストは生体試料に比べて非常に強く、生体試料中に存在する金コロイドを容易に確認することができる。また、形状がきれいな球状をしていることも、金コロイドを確認する手段の一つである。図の右側は嗅神経層、図の中央にある黒い部分が僧帽細胞の樹状突起、図の上側にある灰色の物質がミトコンドリアである。また、嗅神経と僧帽細胞の樹状突起の間にある白い部分（赤矢印）が両細胞間のシナプスである。図中の黄矢印が示す通り、直径約 5 nm の物質が僧帽細胞の樹状突起で確認された。しかし、金コロイドは球状の物質であるのに対し、図中の物質はややいびつな形状であった。また、嗅神経やミトコンドリアにも似たような白い物質が存在している。これは細胞組織のコントラストをつけるために酢酸ウランやクエン酸鉛で電子染色をしたことで、これらの重金属由来のバックグラウンドが検出されているためである。したがって、黄矢印で示した白い物質が金コロイドであるかは不明確であった。この問題を解決するためには、バックグラウンドとの区別ができるサイズの金コロイド（粒径 > 10 nm）を使用しなければならない。また、金コロイドのみの観察により得られた粒径、形状およびコントラストと、試料中に存在する物質を比較し、金コロイドと類似しているかを確認することで、より確実に生体試料中の金コロイドを区別するこ

とができる。

本実験では、TEM を用いて金コロイド（粒径 15 nm）を点鼻投与したマウスの嗅球の糸球体層を観察した。糸球体層では、嗅神経の軸索の終末と、僧帽細胞および房飾細胞の樹状突起（以下、僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起と記す）とシナプスを形成している。軸索終末で粒子が観察されれば、嗅神経へのナノ粒子の侵入と、軸索輸送による軸索終末への移行を確認することができる。さらに、僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起で粒子が観察されれば、嗅神経（一次ニューロン）から僧帽細胞／房飾細胞（二次ニューロン）への侵入を確認することができる。本実験から、ナノ粒子の嗅球への移行および二次ニューロンへの侵入を検討し、嗅神経を介したナノ粒子の中樞神経系への移行経路の存在を解明することを目的とした。

3.4.2 実験方法

本実験では、BALB/c マウス（雄, 10 週齢）を 2 匹用いた。ネンブタール注射液（5 mg/mL）を 350 μ L 腹腔内注射した後、金コロイド（粒径 15 nm, BB International 社製）をマウスの左鼻に 10 μ L 点鼻投与した。投与から 24 時間後、ネンブタール注射液で麻酔をかけ、0.2% ヘパリン含有生理食塩水にて右心房より約 15 分間灌流し、固定液（4%パラホルムアルデヒドと 1%グルタルアルデヒドの混合液）にて約 20 分間固定した。灌流固定後、30 分間室温にて静置して組織を固定し、断頭して嗅上皮と嗅球を摘出し、上記の固定液中で 2 日間浸漬固定した。2 日後、1%オスミウム酸に嗅上皮を 10 分間、嗅球を 30 分間浸した後、0.1M リン酸緩衝液で 30 分間、蒸留水で 20 分間洗浄した。洗浄後、50%, 70%, 80%, 90%, 95%エタノールに各 10 分間氷上で冷やしながらか浸けて徐々に脱水し、さらに 100%エタノールに 15 分間浸けた。その後、100%エタノールとプロピレンオキサイドの等量混合液に 15 分間、プロピレンオキサイドに 30 分間、プロピレンオキサイドとエポン樹脂 (Quetol 812, 日新 EM 社製) の等量混合液に 8 時間、プロピレンオキサイドとエポン樹脂 (1 : 2, v/v) の混合液に 6 時間浸けて徐々に置換した。その後、エポン樹脂に 37°C で 15 時間、60°C で 3 日間浸けて樹脂包埋した。この樹脂をダイヤモンドナイフ (ultra 45°, 日新 EM 社製) を取り付けたウルトラミクロトーム (Reichert-Jung Ultra-cut, Leica 社製) を用いて、厚さが約 60 nm の超薄切片を作成した。作成した超薄切片を、TEM 用のグリッド (Ni グリッド, 日新 EM 社製) に載せ、酢酸ウランに 7 分間、クエン酸鉛に 5 分間浸けて電子染色を行った。染色後、蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させたグリッドを TEM (JEM-1220, 日本電子社製) を用いて観察した。測定条件は加速電圧 80 kV, 倍率は 1000~30 万倍とした。

3.4.3 結果

図 3-13 は本実験で用いた金コロイド（粒径 15 nm）を、TEM 用グリッドに載せて観察した画像である。黒い球状の物質が金コロイドである。粒径はほぼ均一で、15 nm 前後であった。凝集体はほとんど見られず、単体で分散していた。

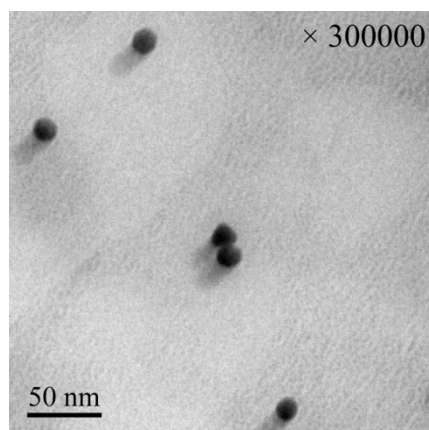


図 3-13 金コロイド（粒径 15 nm）の TEM 画像（倍率 30 万倍）

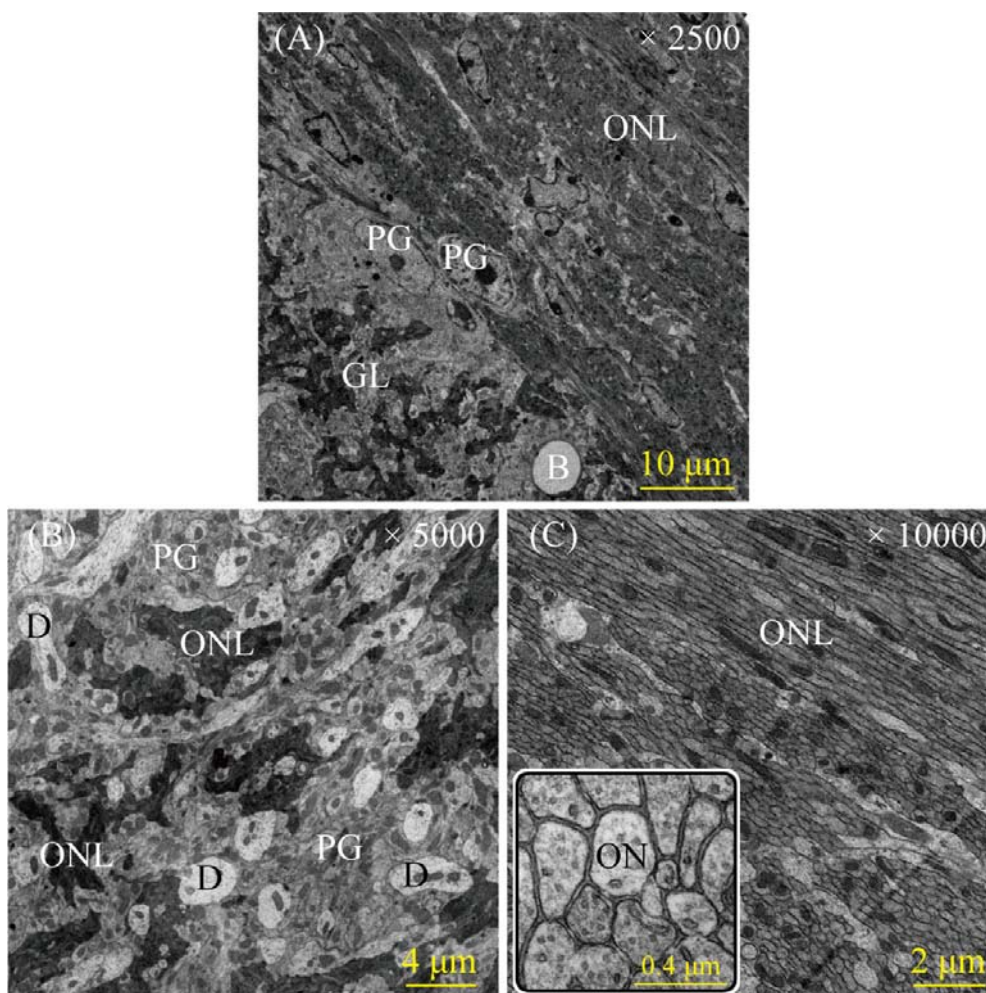


図 3-14 嗅球の嗅神経層および糸球体層の TEM 画像

(A) : 嗅神経層および糸球体層（倍率 2500 倍），(B) : 糸球体層（倍率 5000 倍），
 (C) : 嗅神経層（倍率 10000 倍）（略字）ONL : 嗅神経層，GL : 糸球体層，B : 血管，
 D : 僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起，PG : 糸球体周辺細胞，ON : 嗅神経軸索

図 3-14 は嗅神経層及び糸球体層の TEM 画像である。(A) の画像は、嗅神経層と糸球体層の境目付近を観察した画像である。図の右側に存在する灰色の部分嗅神経層、図の左側に存在する白色と灰色が混ざった部分が糸球体層である。この付近には糸球体周辺細胞の細胞体や、毛細血管も存在する。いずれも形状とコントラストから容易に区別することができる。(B) の画像は、糸球体層の拡大画像である。灰色の部分は嗅神経の軸索終末の束、白色で卵型あるいは棒状に見える部分は僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起、残りのやや薄い灰色で見える部分は糸球体周辺細胞の塊である。また、僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起内や糸球体周辺細胞内に見られる灰色の卵型の物質はミトコンドリアである。いずれも色や大きさから容易に区別することができる。(C) の画像は、嗅神経層の拡大画像である。灰色に見える嗅神経層をさらに拡大すると、左下の図のように見える。直径約 200 nm の嗅神経の軸索が約 20 本集まって嗅神経束を形成し、これらが嗅神経層となって存在している。

図 3-15 は金コロイドを点鼻投与したマウスにおける、投与 24 時間後に解剖した嗅球の糸球体層である。(A) の画像から、嗅神経の束とそれを取り囲むように糸球体周辺細胞が存在している様子が観察された。図の左上部には、僧帽細胞／房飾細胞の大きな樹状突起が存在した。その大きさから、糸球体周辺細胞と容易に区別することができる。また、嗅神経の軸索終末は僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起および糸球体周辺細胞とシナプスを形成していた。このように、嗅神経の軸索終末が僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起だけでなく糸球体周辺細胞ともシナプスを形成することは、Kosakaらにより知られている¹²。(B) の画像

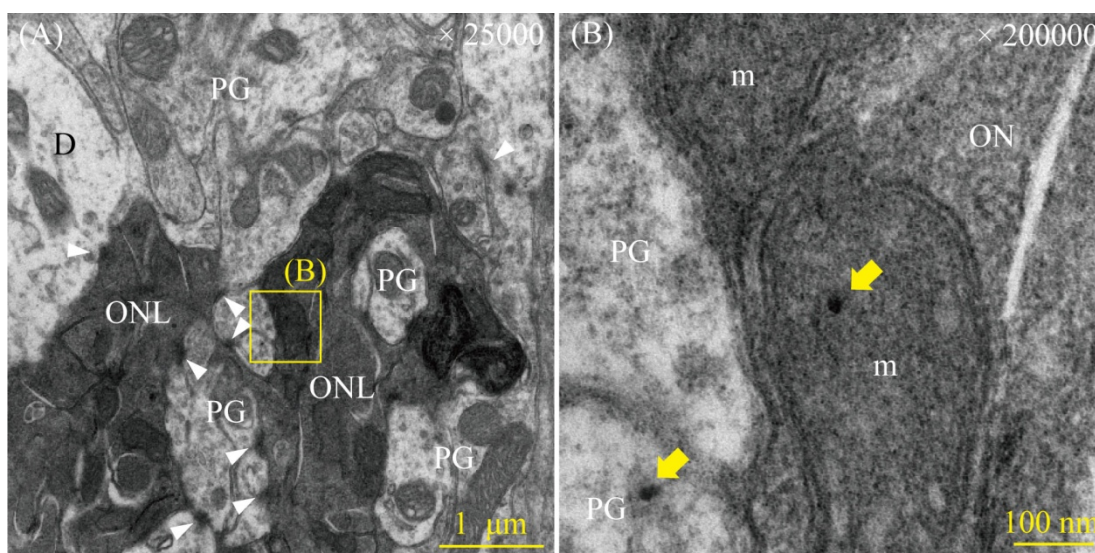


図 3-15 金コロイド (15 nm) を点鼻投与したマウスにおける投与 24 時間後に解剖した嗅球の糸球体層の TEM 画像 (A) : 低倍率像 (倍率 25000 倍), (B) : 黄枠内の拡大像 (倍率 20 万倍) (略字) ONL : 嗅神経層, ON : 嗅神経軸索, D : 僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起, PG : 糸球体周辺細胞, m : ミトコンドリア, 黄矢印 : 金コロイド, 白矢じり : シナプス

は、(A)の黄枠内を拡大した画像である。黄矢印で示した通り、嗅神経のミトコンドリアと、糸球体周辺細胞に黒い球状の物質が存在した。この物質の直径を計測すると、15~20 nmであった。したがって、図 3-13 で観察された金コロイドと非常に似た大きさと形をしていた。ただ、この黒い球状の物質が観察される頻度は非常に少なかった。また、僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起で同様の物質は確認されなかった。

3.4.4 考察

金コロイドを曝露したマウスの嗅球の糸球体層から、黒い球状の物質が観察された。直径は 15~20 nm で球状であり、金コロイドの観察で捉えた物質とほぼ一致していた。金は電子密度が非常に大きいため、TEM 観察では濃い黒色の物質として映る。生体試料にはこのような物質は存在しないため、生体試料中に存在する金コロイドは明らかにコントラストが異なって見える。したがって、糸球体層で観察されたこの黒い球状の物質は、投与した金コロイドである可能性が高い。

図 3-15 では、嗅神経の軸索終末にあるミトコンドリア内で金コロイドが観察された。De Lorenzoは、銀コーティングされた粒径 50 nmの金ナノ粒子をリスザルに点鼻投与したところ、嗅球の糸球体層で粒子がミトコンドリアに選択的に存在していたと報告した¹¹。したがって、嗅粘膜から嗅神経に侵入した金コロイドはミトコンドリアに侵入し、軸索流によってミトコンドリアと一緒に軸索終末まで輸送された可能性が考えられる。さらに、糸球体周辺細胞で金コロイドが確認された。この結果から、軸索終末に到達したナノ粒子は、シナプスを越えることが確認された。しかし、僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起では金コロイドが確認されなかったため、金コロイドの二次ニューロンへの侵入は認められなかった。ただ、嗅神経の軸索終末と僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起および糸球体周辺細胞をつなぐシナプスはともに非対称性シナプスである¹²。したがって、糸球体周辺細胞とのシナプスを越えるならば、僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起とのシナプスも越える可能性は十分に考えられる。また、僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起と糸球体周辺細胞をつなぐシナプスも存在するため¹²、糸球体周辺細胞に侵入した金コロイドがこのシナプスを越えて二次ニューロンへ侵入する可能性もある。

糸球体層で金コロイドが確認されたものの、その数は非常に少なかった。既存の研究では、吸入曝露したナノ粒子が嗅球や脳で有意に増加していることから^{1,2}、顕微鏡観察下では曝露した粒子が相当な頻度で観察されると推測する。観察された金コロイドの数が少なかった理由として、TEMによる観察可能範囲が極端に小さいため、金コロイドが局在する部分の観察ができなかったことが考えられる。ナノ粒子の嗅球への移行先は、Zone-to-zone projectionによりナノ粒子が鼻腔から侵入した嗅粘膜の部位によって決まる⁷。つまり、ナノ粒子の嗅球への投射先は、鼻腔内でのナノ粒子の拡散性もしくは滞留性により大きく影響を受ける。蛍光ポリスチレンナノ粒子の点鼻投与実験では、一部の嗅粘膜で蛍光が確認されたものの、他の部位では確認されなかった。金コロイドの点鼻投与も、蛍光ポリスチレ

ンナノ粒子の点鼻投与と同様の方法で行っており、嗅粘膜への沈着量は部位により異なつたと考えられる。作成した超薄切片の大きさは $0.5\text{ mm} \times 0.5\text{ mm}$ 四方で、その厚さは約 $6 \times 10^{-5}\text{ mm}$ であることから、その体積は約 $1.5 \times 10^{-5}\text{ mm}^3$ である。マウスの嗅球の体積は、10週齢で約 8 mm^3 と報告されており¹³、一枚の超薄切片から観察できる範囲は、嗅球全体の約 $1.9 \times 10^{-4}\%$ と非常に限られる。したがって、金コロイドの嗅粘膜への沈着が局在的であった場合、嗅球の糸球体層への移行部位もZone-to-zone projectionにより局在的となるため、金コロイドが局在する部位の糸球体層を観察できる確率は非常に低くなると推測される。このように、嗅球の糸球体層で金コロイドの局在は確認されなかったものの、ナノ粒子が嗅神経を介して嗅球へ移行することが解明され、さらには脳までナノ粒子が到達する可能性が示唆された。

3.5 結論

本章では、ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系の移行経路を、共焦点レーザー顕微鏡、透過型電子顕微鏡を用いたイメージングにより検討した。蛍光ポリスチレンナノ粒子の点鼻投与実験では、鼻腔に投与した蛍光ポリスチレンナノ粒子が嗅粘膜に沈着、侵入することが確認された。嗅粘膜に侵入した蛍光ポリスチレンナノ粒子のほとんどは嗅上皮に滞留したが、一部は基底膜を通過し、粘膜固有層で確認された。この結果から、嗅神経に侵入したナノ粒子が軸索輸送により嗅球へと移行する可能性が示唆された。金コロイドの点鼻投与実験では、嗅球の糸球体層に存在する嗅神経の軸索終末と、それを取り囲む糸球体周辺細胞で、金コロイドに類似した物質が確認された。その大きさと形状、およびコントラストから金コロイドである可能性が高い。この結果から、嗅神経に侵入したナノ粒子は軸索終末まで到達し、さらにはシナプスを越えて糸球体周辺細胞へ侵入することが確認された。僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起では金コロイドが観察されなかったため、二次ニューロンへの金コロイドの侵入は認められなかった。しかし、糸球体周辺細胞とのシナプスを越えた事実から、二次ニューロンへナノ粒子が侵入する可能性は十分に考えられる。

本研究では、大気中より曝露されることのない非溶解性のナノ粒子を曝露し、嗅神経を介した中枢神経系への移行経路が存在することを確認した。今後の展望として、我々が実際に曝露されるナノ粒子が、この移行経路で中枢神経系まで移行するかを解明する必要がある。実フィールドには様々なナノ粒子が存在し、その中には生体に悪影響を及ぼす物質を含むナノ粒子も存在する。これらがこの移行経路に沿って中枢神経系へ移行すれば、神経疾患を引き起こす可能性がある。既存の研究では、吸入曝露したナノ粒子が中枢神経系で確認されており¹²、この移行経路によりナノ粒子が中枢神経系へ悪影響に及ぼす可能性は十分に考えられる。

参考文献

- 1) Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W. and Cox C. (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicology*. **16**: 437-445
- 2) Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J., Potter R., Maynard A., Ito Y., Finkelstein J. and Oberdörster G. (2006) Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System: Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. *Environmental Health Perspectives*. **114**: 1172-1178
- 3) Adams D. R. (1972) OLFATORY AND NONOLFATORY EPITHELIA IN NASAL CAVITY OF MOUSE, PEROMYSCUS. *American Journal of Anatomy*. **133**: 37-50
- 4) Nomura T., Takahashi S. and Ushiki T. (2004) Cytoarchitecture of the normal rat olfactory epithelium: Light and scanning electron microscopic studies. *Archives of Histology and Cytology*. **67**: 159-170
- 5) Buck L. and Axel R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*. **65**: 175-187
- 6) Nagao H., Yamaguchi M., Takahashi Y. K. and Mori K. (2002) Grouping and representation of odorant receptors in domains of the olfactory bulb sensory map. *Microscopy Research and Technique* **58**: 168-175
- 7) Mori K. and Yoshihara Y. (1995) MOLECULAR RECOGNITION AND OLFATORY PROCESSING IN THE MAMMALIAN OLFATORY SYSTEM. *Progress in Neurobiology*. **45**: 585-619
- 8) Mombaerts P., Wang F., Dulac C., Chao S. K., Nemes A., Mendelsohn M., Edmondson J. and Axel R. (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*. **87**: 675-86
- 9) 川本忠文 (2009) 特集 (硬組織) 非脱灰硬組織凍結切片標本作製技術 (川本法 2008) とその応用, 病理技術研究会誌, **72**: 76-83
- 10) Mery S., Gross E. A., Joyner D. R., Godo M. and Morgan K. T. (1994) Nasal Diagrams: A Tool for Recording the Distribution of Nasal Lesions in Rats and Mice. *Toxicologic Pathology*. **22**: 353-372
- 11) De Lorenzo A. J. (1970) The olfactory neuron and the blood-brain barrier. *Taste and Smell in Vertebrates. London, Churchill*: 151-176
- 12) Kosaka T. and Kosaka K. (2005) Intraglomerular dendritic link connected by gap junctions and chemical synapses in the mouse main olfactory bulb: Electron microscopic serial section analyses. *Neuroscience*. **131**: 611-625
- 13) Pomeroy S. L., LaMantia A. S. and Purves D. (1990) Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, **10**: 1952-1966

第4章 ディーゼル排気粒子曝露後の嗅神経イメージング

4.1 背景

蛍光ポリスチレンナノ粒子および金コロイドの点鼻投与実験により，ナノ粒子が嗅神経内に侵入して嗅球まで到達することが確認された。しかし，これらの粒子は大気中に存在せず，日常生活で曝露されることのない粒子である。したがって，実際に我々が曝露されうるナノ粒子でも，嗅神経を介して中枢神経系まで到達するかを検討する必要がある。大気中に存在するナノ粒子でも嗅神経を介して中枢神経系へ移行されれば，ナノ粒子曝露が神経疾患に結びつく可能性は十分に考えられる。

本章では，浮遊性粒子状物質の主要成分であるディーゼル排気粒子（DEP）をマウスに曝露し，DEPが嗅神経を介して嗅球へ移行するかを検討した。DEPにはエンジンオイル由来の様々な金属化合物が付着しており，その中には毒性の高い元素も含まれている。DEPが嗅神経を介して中枢神経系へ侵入した場合，その付着元素により神経疾患を引き起こすことが懸念される。そこで，はじめにエンジンオイルとDEPに含まれる元素の定量を行った。これにより，DEPに実際に含まれる元素を確認し，その組成がエンジンオイルに含まれる元素と関連があるかを検討した。次に，DEPを吸入曝露あるいは点鼻投与したマウスの嗅粘膜および嗅球を，大型放射光施設（SPring-8）にて放射光蛍光 X 線分析（SR-XRF）を行い，嗅神経のイメージングを行った。SR-XRFを用いた元素マッピングにより，DEP

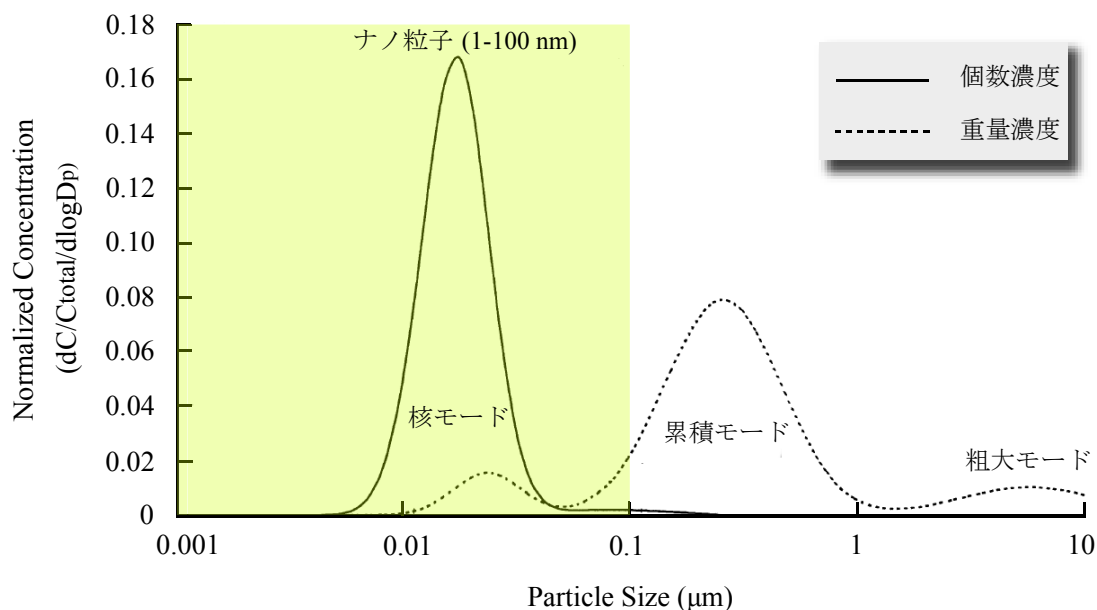


図 4-1 DEPの個数濃度と重量濃度¹（一部改編）

付着元素が嗅粘膜および嗅球内で蓄積しているかを観察した。さらに、得られた元素マッピング像より元素の局在が確認された部位において、X線吸収微細構造法（XAFS）分析を行い、その元素の局在がDEP由来であることを検討した。

4.2 ディーゼル排気粒子の物理化学的特性

DEPは100種類以上の化学物質を含む気体の混合物であり、浮遊性粒子状物質の主要成分である。一般に、DEPは核モード、累積モード、粗大モードの3つのピークが存在する（図4-1）¹。核モードの粒子は金属化合物、単体炭素、および排気希釈と冷却の間に粒子を形成する半揮発性の有機粒子および硫黄の化合物からなると考えられている。排気・冷却過程において、これらの半揮発性物質が累積モードの粒子の表面に凝縮することが知られている²。核モードのDEPは粒径が5～50 nmの粒子で構成される。重量濃度では全体の1～20%と比較的少ないものの、個数濃度では全体の90%以上を占める。累積モードのDEPはエンジン内での燃料およびピストンリングから浸み出したエンジンオイルの不完全燃焼によって生成したススの1次粒子が、ブラウン運動によって互いに凝集した粒子である。粒径は30～300 nmで、主に炭素質の塊と吸着物質から構成されていると考えられている。粗大モードのDEPは、シリンダ表面あるいは排気管表面に堆積した粒子状物質の剥離や再分散によって形成されると考えられている。粒径が1 μm以上の粒子で構成され、重量濃度は全体の5～20%を占めている。

DEPの化学成分はスス、炭化水素、可溶性有機成分、硫黄分、金属分などに分類される（図4-2）³。主成分は炭素であり、元素状炭素や有機性炭素が全体の約6割を占める。DEPに含まれる有機物は、一般に粒子中の10～30%程度を占め、

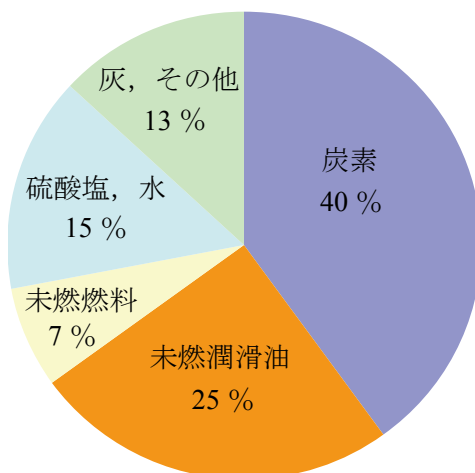


図 4-2 DEPの構成成分³

種々の多環芳香族炭化水素（Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ; PAH）を含んでいる。金属化合物は粒子全体の約 1%含まれている。その組成は燃料やエンジンオイルの添加剤に由来し、Na, Al, Ca, Fe, Znが主に含まれている。したがって、DEPに付着する金属化合物の組成は燃料やエンジンオイルに含まれる添加剤の組成に依存し、試料によってはV, Co, As, Se, Sb, Hgなどの人体に有害な金属元素が含まれている⁴。

DEPの化学組成や粒径分布は車両の種類、走行条件、燃料やエンジンオイルの組成、排気浄化装置の有無や種類によって顕著に異なる^{5,6,7}。したがって、DEPの計測にはその物理的・化学的特徴を実態に即して把握することが求められる。

4.3 エンジンオイルおよび DEP の組成分析

4.3.1 はじめに

DEPの主成分は炭素や未燃のエンジンオイルであり、その他にも硫酸塩、灰分などが多く含まれる。その中で、DEP全体の約 1%は金属化合物が含まれている³。溝端らは、DEPの組成成分を定量したところ、様々な元素が確認された（図 4-3）⁴。これは、燃料やエンジンオイル由来であると考えられる。しかし、DEPの化学組成は車両の種類や使用する燃料やエンジンオイルによって顕著に異なる。したがって、DEPの曝露実験を行う上でその化学組成を予め把握する必要がある。

本実験では、ICP-MS を用いてエンジンオイルと DEP の組成分析を行った。エンジンオイルは、使用前と使用後のエンジンオイルに含まれる元素を定量した。これらのエンジンオイル中に含まれる元素の重量濃度を比較し、ディーゼルエンジン稼働によりその重量濃度がどのように変化するかを検討した。また、このエンジンオイルを用いて実際にディーゼルエンジンを稼働した。発生したディーゼル排気から、DEP と DEP を除いたガス成分をそれぞれフィルターに捕集し、これらに含まれる元素を ICP-MS で定量した。これらの実験から、DEP およびガス成分の組成を把握するとともに、エンジンオイルに含まれる元素が DEP の組成に影響を与えるかを検討した。

4.3.2 実験方法

4.3.2.1 DEP のサンプリング

ICP-MS 分析用オイルとして、日野ブルーリボン e-PRO EXTRA（日野自動車社製）を用いた。実験群は、未使用のエンジンオイル（使用前オイル）と、ディーゼルエンジンを稼働させた後に採取したエンジンオイル（使用后オイル）の 2 群とした。使用后オイルのサンプリングは、国立環境研究所のナノ粒子曝露棟にて行った。ディーゼルエンジンを回転数 2000 rpm, トルク 0 N・m で稼働し、稼働積

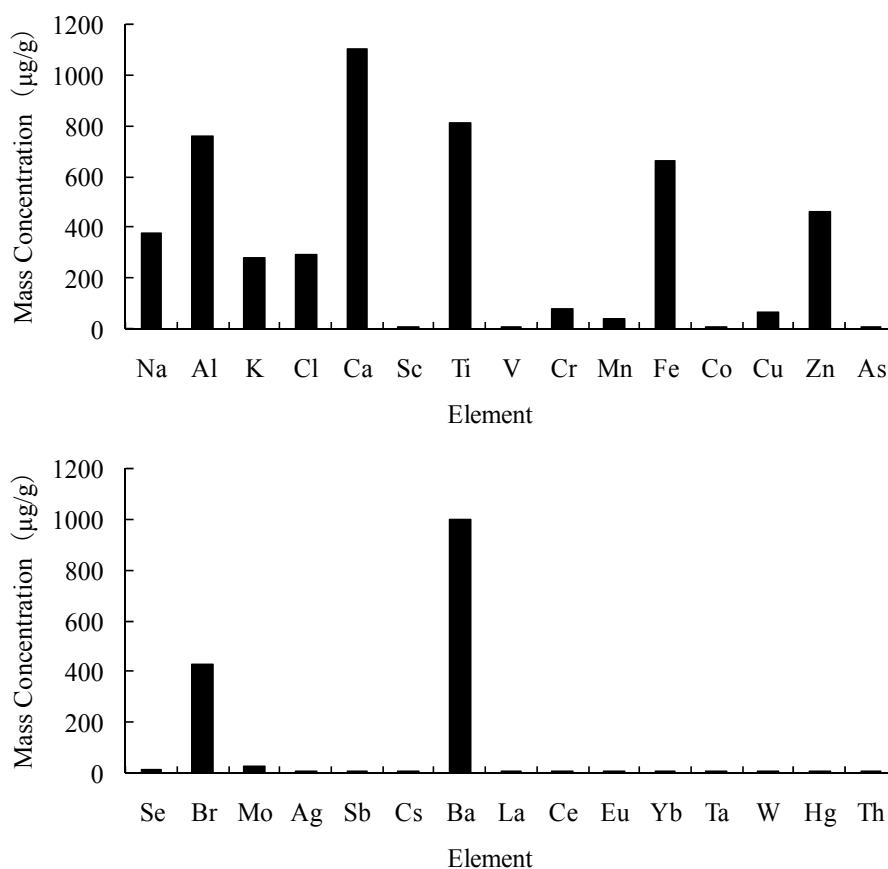


図 4-3 DEPの組成成分⁴（一部改編）

算時間が 250 時間に達した時点でオイルを採取した。

DEP とディーゼル排気に含まれるガス成分のサンプリングも、国立環境研究所のナノ粒子曝露棟にて行った。実験群は、ディーゼル排気のガス成分のみを捕集したフィルターと、DEP を捕集したフィルターの 2 群とした。はじめに、ディーゼルエンジンを回転数 2000 rpm, トルク 0 N・m で稼働し、ディーゼル排気ガスを発生させた。発生した排気ガスを希釈トンネルに導入し、これをミニポンプ (Σ-100, 柴田科学社製) で吸引した。排気ガス発生場所から 10 m 離れた希釈トンネル内にて、DEP を 2 枚のテフロンフィルター (住友電工社製) にそれぞれ 3.5~4.1 m³ ずつ捕集した。また、発生した排気ガスから DEP をフィルターで捕集した残りのガス成分のみを、2 枚のテフロンフィルターにそれぞれ 6.1~6.2 m³ ずつ捕集した。

4.3.2.2 エンジンオイルの湿式分解

サンプリングした使用前オイルと使用后オイルをそれぞれ 1 g 秤量し、高压分解用容器に入れた。サンプル数は各群 2 本ずつとした。各容器に 60% 硝酸 4 ml, 30% 過酸化水素 1 mL を加え、マイクロウェーブ湿式分解装置 (MDS2000, CEM 社製) を用いて出力 400 W, 照射時間 10 分間で高压分解し、オイルを溶解した。

マイクロウェーブ照射後、室温で静置して冷却した。容器中のオイルから揮発した蒸気が出なくなったことを確認した後、オイル溶解液を遠沈管に移した。別の遠沈管に 800 μL 分注し、内部標準溶液として 2 ppm インジウム溶液を 100 μL を加えた後、蒸留水を 3.1 mL 加えて希釈した。この溶液を ICP-MS 用測定試料液とした。また、オイルを添加せずに同様の湿式分解処理を行い、得られた溶液をブランクとした。

4.4.2.3 DEP の湿式分解

捕集後のフィルター（ガス成分捕集フィルター2枚、DEP 捕集フィルター2枚）をそれぞれ高圧分解用容器に入れ、60%硝酸 6 mL, 50%フッ化水素酸 3 mL, 30%過酸化水素 1 mL を加えた。マイクロウェーブ湿式分解装置を用いて出力 250 W（照射時間 2 分）、0 W（1 分）、250 W（5 分）、400 W（5 分）、500 W（5 分）、600 W（5 分）、400 W（30 分）で高圧分解し、テフロンフィルターに捕集したガス成分や DEP を溶解した。マイクロウェーブ照射後、室温で静置して冷却した。容器から揮発した蒸気が出なくなったことを確認した後、4%ホウ酸を 30 mL 入れた。マイクロウェーブ湿式分解装置を用いて出力 400 W, 照射時間 10 分間で処理した後、室温で静置して冷却した。冷却後、フィルターを除き、溶解液を遠沈管に移した。別の遠沈管に 9.75 mL 分注し、内部標準溶液として 2 ppm のインジウムを 250 μL 加えた。この溶液を ICP-MS 用の測定試料液とした。また、未使用のフィルターを高圧分解容器に入れて同様の湿式分解処理を行い、得られた溶液をブランクとした。

4.4.2.4 ICP-MS を用いた定量分析

湿式分解により作成した溶液を、ICP-MS（HP4500, Hewlett Packard 社製）を用いて定量した。図 4-3 で質量濃度が高かった元素を中心に、測定対象元素を Na, Al, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Ga, Br, Sr, Zr, Mo, Cd, Cs, Ba, Pt, Pb とした。検量線の希釈系列は、0, 10, 100, 500, 1000 ppb とした。内部標準元素として、インジウムを 50 ppb となるように加えた。ICP-MS の分析条件は、プラズマガス流量 15 L/min, 補助ガス流量 1.0 L/min, キャリアガス流量 1.2 L/min, 質量数ごとの積分時間 3 秒, 1 試料の測定繰り返し回数 3 回に設定した。装置に試料を導入後、試料の置換時間を 30 秒, ペリスティックポンプによる試料の置換速度を 0.50 rps, 安定化待機時間を 30 秒とし、試料を測定した。得られたエンジンオイルの定量値からブランクの定量値を減じた後、検量線を用いてエンジンオイル中の重量濃度 ($\mu\text{g/g}$) を算出した。同様に、DEP およびガス成分捕集フィルターの定量値からブランクの定量値を減じた後、DEP およびガス成分中の重量濃度 (ng/g) を算出した。

4.3.3 結果

4.3.3.1 エンジンオイルに含まれる金属元素

表 4-1 に、使用前オイルと使用後オイルに含まれる元素の重量濃度 ($\mu\text{g/g}$) を示す。測定した元素の内、定量下限よりも高い値を示した元素のみを、使用前オイル重量濃度の高い順に表記した。使用前オイルと使用後オイルより Zn, Ca, Na, Al, Mo, Ti, K, Cr, Sr, Sc が検出された。特に、Zn, Ca, Na が高い重量濃度を示した。使用前オイルと使用後オイルの重量濃度を比較すると、使用後オイルの Na の重量濃度が使用前オイルと比べて有意に減少し、Zn, Ca, Mo, Ti, K, Sr の重量濃度も使用前オイルより減少した。また、Mn, Cu は使用前オイルからは検出されなかったが、使用後オイルからはわずかに検出された。

4.3.3.2 DEP に付着した金属元素

表 4-2 は、ガス成分および DEP を捕集したフィルターに含まれる元素の重量濃度 (ng/g) を示している。測定した元素の内、定量下限よりも高い値を示した元素を、ガス成分中の重量濃度が高い順に表記した。ガス成分, DEP とともに Na, Ti, Ni が検出された。一方, Al, Cr, V はガス成分のみで検出され, Ca, Zn は DEP のみで検出された。表 4-1 と比較すると, Na, Al, Ca, Ti, Cr, Zn はエンジンオイル中でも検出されたが, V と Ni はエンジンオイル中では検出されなかった。

表 4-1 使用前および使用後のエンジンオイルに含まれる元素の重量濃度

元素	使用前オイル ($\mu\text{g/g}$)	使用後オイル ($\mu\text{g/g}$)
Zn	1858	1636
Ca	498	476
Na	9.29	5.78 *
Al	1.62	1.66
Mo	1.41	1.29
Ti	1.30	1.16
K	0.79	0.57
Cr	0.67	0.77
Sr	0.28	0.24
Sc	0.03	0.03
Mn	N.D.**	0.10
Cu	N.D.**	0.07

* オイル使用前に対する t 検定結果 ($p < 0.05$)

** N.D. : Not Detected

表 4-2 DEP とガス成分に含まれる元素の重量濃度

元素	ガス成分 (ng/g)	DEP (ng/g)
Na	31.8	89.2
Al	9.35	N.D.*
Ti	4.52	1.32
Cr	3.01	N.D.*
Ni	0.54	0.21
V	0.41	N.D.*
Ca	N.D.*	34.9
Zn	N.D.*	23.6

* N.D. : Not Detected

4.3.4 考察

エンジンオイル中の元素の定量では、使用前オイル、使用后オイルともに Zn, Ca, Na, Al, Mo, Ti, K, Cr, Sr, Sc が検出された。値が高かった上位 6 元素 (Zn, Ca, Na, Al, Mo, Ti) は、エンジンオイルの添加剤として使用される。したがって、エンジンオイルに含まれる金属化合物は添加剤の寄与が大きいと考えられる。使用前オイルと使用后オイルを比較すると、使用后オイル中の Na の重量濃度が有意に減少し、Zn, Ca, Mo, Ti, K, Sr の重量濃度も使用後のオイルの方が小さくなった。この結果から、ディーゼルエンジンを稼働させるとエンジンオイルに含まれる金属化合物や金属イオンが排気されていることが示唆される。

DEP 捕集フィルターとガス成分捕集フィルター中の元素の定量では、Na, Al, Ca, Ti, V, Cr, Ni, Zn が検出された。この内、Na, Al, Ca, Ti, Cr, Zn はエンジンオイル中でも検出されたことから、DEP の組成は使用しているエンジンオイルの影響を受けると考えられる。一方、ガス成分では V, DEP では Ni が検出されたが、エンジンオイル中では検出されなかった。V や Ni はエンジンの部品に使用され、また重油中にも多く含まれている。したがって、エンジンの部品やディーゼル燃料に含まれる金属化合物や金属イオンもディーゼル排気中に混入した可能性が考えられる。

DEP 捕集フィルターとガス成分捕集フィルターから検出された Na, Al, Ca, Ti, V, Cr, Ni, Zn の内、Al, Cr, V はガス成分のみで検出され、Ca と Zn は DEP のみで検出された。この結果から、ディーゼル排気に含まれる金属化合物や金属イオンが DEP へ付着するかは、元素種に依存すると考えられる。DEP 中の重量濃度は Na, Ca, Zn が大きかったことから、これらの元素が DEP に付着しやすいことが考えられる。

4.4 DEP を吸入曝露したマウスの嗅粘膜および嗅球のイメージング

4.4.1 はじめに

DEPの組成分析より、DEPにはNa, Ca, Ti, Ni, Znが検出された。これらの金属元素が嗅神経を介して中枢神経系へ移行すれば、神経疾患を引き起こす可能性がある。特に、Znはアルツハイマー病との関連が示唆されており⁸、DEPの嗅神経を介した中枢神経系への移行を解明することは、アルツハイマーをはじめとする神経疾患との関連を解明することにもつながる。

著者らの研究では、SPring-8のビームラインBL37XUにおける元素マッピングにより、DEPを吸入曝露したマウスの嗅粘膜、嗅球でDEP由来と考えられる元素の局在を確認した⁹。しかし、得られた元素マッピング像と一般染色像の重ね合わせでは、嗅神経の存在する部位に元素が局在しているかを判断することはできない。そこで、嗅神経の存在する部位を確実に元素マッピングするため、SR-XRFを行う前に免疫染色を行った。免疫染色により嗅神経を特異的に染色することができ、嗅粘膜、嗅球に存在する嗅神経の分布を観察することができる。その抗体として、Neuronal nuclei (NeuN) を用いた。NeuNは神経細胞の核蛋白を抗原とし、中枢神経の核や細胞質と反応し染色することができる。

SPring-8のBL37XUにて、嗅粘膜および嗅球のSR-XRFを行った。SR-XRFは蛍光X線のエネルギーと強度を測定して、試料に含まれる元素の種類や濃度を知る方法である。その特徴として、(1) 多元素同時分析を迅速にできる、(2) ベリリウムより原子番号の大きい全ての元素を定性分析および定量分析できる、(3) 大気中で分析することができ、試料の状態や形態、大きさの制約がない、(4) 主成分から数十 ppb までの超微量成分の分析が可能である点が挙げられる。本実験では、SR-XRFで得られた元素マッピング像を免疫染色像と重ね合わせることで、嗅粘膜および嗅球内の元素分布を観察し、DEPが嗅神経内に侵入しているかを検討した。

4.4.2 実験方法

4.4.2.1 マウスへのDEP吸入曝露

本実験では、BALB/c マウス（雄，8 週齢）を 4 匹用いた。対照群と曝露群の 2 群とし、各群にマウスを 2 匹用いた。曝露実験は、国立環境研究所のナノ粒子曝露棟にて行った。ディーゼルエンジンを稼働させ、ディーゼル排気（DEP とガス成分を含む）を曝露チャンバーに導入した。その際、DEP の中心径が 40 nm となるよう、希釈トンネルの風速を調整した。曝露群のマウスを曝露チャンバー内に入れ、重量濃度が 0.1 mg/m^3 の DEP を 4 週間吸入曝露した。対照群のマウスには、DEP をフィルターにトラップさせ、ガス成分のみの吸入曝露を 4 週間行った。曝露終了後、マウスを麻酔下にて安楽死させ、頭部を切断した。これを液体窒素で

急速凍結した後， -80°C で凍結保存した。

4.4.2.2 切片の作成

凍結保存していた頭部を包埋容器中に入れ，頭部が完全に浸かるまで凍結組織包埋剤（O.C.T. Compound, Tissue-Tek 社製）を入れた後，ドライアイスで冷却したヘキサン（約 -75°C ）中に入れて頭部を包埋した。完成した包埋ブロックをクライオスタット（CM3050S, Leica社製）に装着し，冠状面にて切片を作成した。切片の作成には川本法を用いた¹⁰。面出しをした後，粘着フィルム（Cryofilm Type II・C, Leica社製）を包埋ブロックの表面に貼り付け，薄切した。この方法により，未脱灰の組織においても，組織の破壊が少ない切片が作成できる。切片は嗅粘膜，嗅球が観察できる部位を選定して作成した。各切片の厚さは $50\text{ }\mu\text{m}$ とした。

4.4.2.3 免疫染色

切片が貼り付いた粘着フィルムをスライドグラスに載せ，これに免疫染色を行った。4%ホルムアルデヒド溶液を $300\text{ }\mu\text{L}$ 滴下し，30 分間室温で遮光して静置し，組織を固定した。PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄した後，切片の周りにリキッドブローカーを塗布した。塗布後，ブロッキング液（表 4-3）を $300\text{ }\mu\text{L}$ 滴下し，1 時間室温で遮光して静置した。1 時間後，ブロッキング液を除去し，一次抗体（表 4-3）を $120\text{ }\mu\text{L}$ 滴下し，1 晩 4°C で遮光して静置した。翌日，PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄した後，二次抗体（表 4-3）を $120\text{ }\mu\text{L}$ 滴下し，2 時間室温で遮光して静置した。その後，PBS で 5 分間 \times 3 回洗浄し，染色を完了した。この切片を，共焦点レーザー顕微鏡（FV300, オリンパス社製）を用いて観察した。観察後，粘着フィル

表 4-3 ブロッキング液，一次抗体および二次抗体の組成

溶液	溶液の組成と作成方法
ブロッキング液	1% BSA (Bovine Serum Albumin)
	1% NGS (Normal Goat Serum)
	0.3% Triton X-100
	0.5% NaN_3
	*上記の濃度で 10 mM PBS 中に添加
一次抗体	NeuN (Neuronal Nuclei, ホスト:Mouse) *ブロッキング液で 1000 倍に希釈
二次抗体	Alexa Fluor 546 (Anti-Mouse IgG Antibodies, ホスト:Goat) *ブロッキング液で 1000 倍に希釈

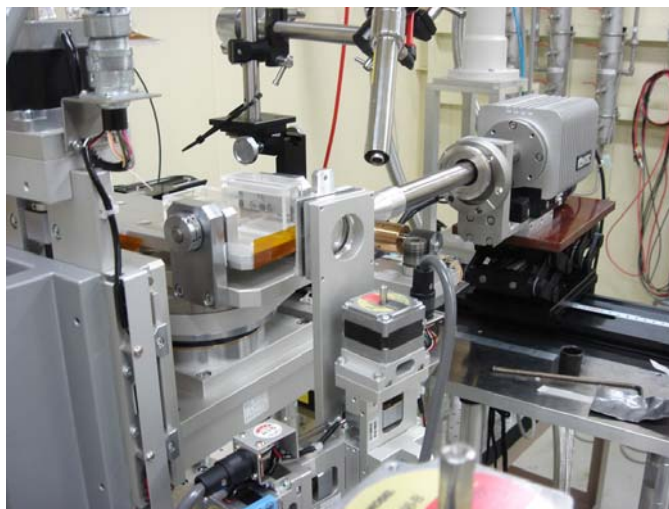


図 4-4 シンクロトロン放射光励起蛍光 X 線分析装置

ムをスライドガラスから剥がし、アクリル板の中心部に円形の穴を開けた基材に静置し、風乾させたものを SR-XRF 測定試料とした。

4.4.2.4 SR-XRF を用いた元素マッピング

SPring-8 のビームライン BL37XU に設置されたシンクロトロン放射光励起蛍光 X 線分析装置 (SR-XRF) を用いて元素マッピングを行った (図 4-4)。この装置はハッチ外で光学顕微鏡 (倍率 200 倍) により測定領域を決定し、その領域に放射光を照射する。シンクロトロン放射光の発光点から約 55 m 後方にあるハッチにて、真空封止型アンジュレータにより高輝度の X 線を Si (111) 分光結晶で単色化した後、10 μm のベリリウム箔窓 ($\phi 20\text{ mm}$) を通過し、高調波除去用の水平偏向の 2 枚の K-B ミラーを経て試料に放射光を照射させている。

はじめに、ハッチ外にある光学顕微鏡で元素マッピングする組織の場所を決定した後、組織層の幅に応じて元素マッピング領域のサイズを設定した。設定完了後、放射光を照射し元素マッピングを開始した。元素マッピングは、設定した測定領域の左下端から始まり、右方向へとビームを 1 μm ずつ移動させる。右端まで移動すると、1 μm 上側に移動し、また左端から右端へと移動する。最終的に、設定した領域の右上端まで到達した時点で終了となる。照射するビームのエネルギーを 10 keV、1 点の分析時間を 1 秒として、ビームを照射した。使用したビームのエネルギーは 10 keV、ビームサイズは 2.3 (水平方向) \times 1.6 (垂直方向) μm^2 に調整した。

BL37XU には、検出器からのチャンネルが 7 個設けられている。その内 6 個を元素マッピング用のチャンネルとし、残りの 1 個を励起された総 X 線のカウント値検出用のチャンネルとした。検出される蛍光 X 線はカウント値として求められる。ビームを照射した点ごとに、測定対象とした 6 元素のカウント値が得られる。

放射光を用いた元素分析では、励起効率や蛍光収率が低い軽元素の測定は難しいため、カリウムより重い元素を測定対象元素とした。

嗅神経の元素マッピングを行う前に、4.3.2.1でサンプリングしたDEP捕集フィルターにおけるSR-XRFを行った。照射ビームのエネルギーは10 keVと設定した。この分析でカウント値が高かった元素と、DEPの組成分析で検出された元素から、元素マッピングに最適な6元素を選定した。選定した6元素を各チャンネルに設定し、嗅粘膜および嗅球の元素マッピングを行った。

4.4.2.5 画像処理

元素マッピングにより得られたカウント値を、虹色のグラデーション（高いカウント値を赤色，低いカウント値を青色）で表し，元素マッピング像とした。元素間の比較を行うため，グラデーションの範囲を6元素とも同じ範囲とした。カウント値を対数に変換し，グラデーションのコントラストが最適となるようなグラデーションの範囲（0～60 count）を設定した。60以上のカウント値は全て赤色で表示した。

4.4.2.6 クリューバー・バレーラ染色

元素マッピング後に，切片をクリューバー・バレーラ染色法により染色した。この染色法により，神経細胞の核小体を深青色，ニッスル小体を紫色，髄鞘を青色に染めることができる。はじめに，組織が付着した粘着フィルムを0.1%ルクソールファースト青液（表4-4）に入れ，60℃で7時間染色した。7時間後，0.1%ルクソールファースト青液に浸したまま，室温で2時間放冷した。2時間後，95%エタノールで5分間分別した後，蒸留水Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ（3槽）で2分間洗浄した。洗浄後，0.1%炭酸リチウムで5分間分別した後，70%エタノールⅠ，Ⅱ，Ⅲで約2～3分間分別した。次に，0.1%クレシル紫液（表4-4）に入れ，50℃で2分間染色した。その後，95%エタノールⅠ，Ⅱ，Ⅲで5分間分別した後，キシレンで5分間透徹した。この組織をスライドガラスの上に載せ，エンテランニュー封入剤

表 4-4 クリューバー・バレーラ染色液の作成方法

溶液	作成方法	
0.1% ルクソールファースト青液	ルクソールファーストブルー	1 g
	95% エタノール	500 mL
	10% 酢酸	2.5 mL
0.1% クレシル紫液	クレシルバイオレット	0.1 g
	蒸留水	100 mL
	10% 酢酸	15 滴

を1～2滴組織の上に滴下し、カバーガラスを載せて封入した。封入剤が固まってプレパラートが完成した後、光学顕微鏡で組織を観察した。

4.4.3 結果

4.4.3.1 SR-XRF による DEP の組成分析

図4-5に、DEP捕集フィルターのSR-XRFにより得られたスペクトルを示す。横軸は検出された蛍光X線のエネルギー (keV)、縦軸は1秒間あたりに得られたカウント値 (CPS) である。図中のスペクトルは、DEP捕集フィルターのSR-XRFにより得られたCPSから、未使用のフィルターのSR-XRFより得られたCPSを減じた後のスペクトルである。得られた蛍光X線スペクトルから、Ar, Ca, Fe, Cu, Zn, Geが検出された。これらの元素の内、ArとGeはバックグラウンドが高いために検出されたものである。Arは空气中に存在するために検出された。GeはBL37XUにおいて、蛍光X線を検出するための半導体検出器の分光結晶として用いられているために検出された。

Ar, Geを除いた残りの元素 (Ca, Fe, Cu, Zn) は、DEPより検出された元素である。したがって、元素マッピングを行う6元素の内、これらの4元素をまず測定対象元素に選定した。残り2元素は4.3でDEP捕集フィルターより検出されたNiと、溝端らのDEP組成分析で検出されたBrを選定した (図4-3)。

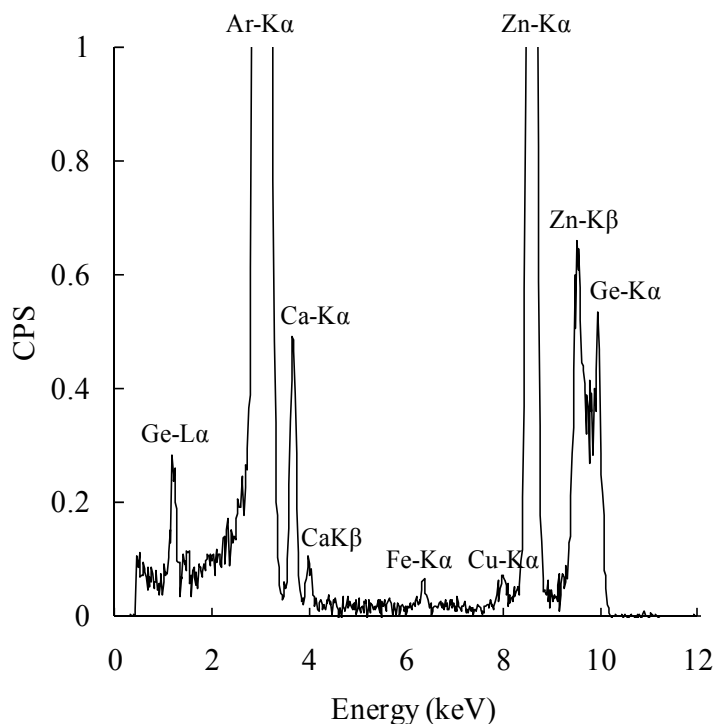


図4-5 SR-XRF による DEP の蛍光 X 線スペクトル

横軸：励起エネルギー (keV)、縦軸：1 秒間あたりに得られたカウント値 (CPS)

4.4.3.2 嗅粘膜における元素マッピング

図 4-6 に、対照群のマウスの嗅粘膜における元素マッピング部位の染色像を示す。(A) は切片の全体像に元素マッピング部位（黄枠内）を記した図，(B) はクリューバー・バレラ染色後に光学顕微鏡で撮像した図（倍率 400 倍），(C) は NeuN で免疫染色した後，共焦点レーザー顕微鏡で撮像した図（倍率 400 倍）である。免疫染色像では，嗅上皮，基底膜，粘膜固有層を確認することができた。鼻腔との境目に存在する粘膜層や，粘膜固有層に存在する嗅神経束が赤色で浮かび上がっている。一方，一般染色像では嗅上皮，粘膜固有層ともほぼ一様に染色されており，組織の構造を把握することは困難であった。また，元素マッピング部位は放射光照射により組織が変性したため，染色されなかった。

図 4-7 は，図 4-6 の (C) に Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br の元素マッピング像を重ね合わせたものである。元素マッピングの結果，篩板の部分では 6 元素ともに高いカウント値を示した。特に，Ca は嗅粘膜全体が 30 count 前後であるのに対し，骨組織である篩板では 80 count を超えた。したがって，Ca の元素マッピングから篩板の存在する部位を判断することができた。また，Ca の元素マッピングでは，鼻腔の部位においても 15～20 count を示しており，嗅粘膜と鼻腔の境界の見分けが困難であった。Fe, Cu, Zn の元素マッピングでは，嗅上皮で鼻腔や粘膜固有層よりも高いカウント値を示した。一方，粘膜固有層ではカウント値はほぼ得られず，鼻腔との差は見られなかった。また，Ni, Br の元素マッピングでは，嗅粘膜全体でカウント値が得られなかった。

図 4-8 は，曝露群のマウスの嗅粘膜である。画像の右側が鼻腔，左側が鼻中隔である。対照群の嗅粘膜と同様に，免疫染色像では嗅上皮の粘膜層が赤く染まり，粘膜固有層の嗅神経束がスポット状に赤く染まった。一方，鼻中隔は全く染まらなかった。また，一般染色像では組織全体が紫色に染まったが，ほぼ一様に染まっており組織の構造を把握することはできなかった。

図 4-9 は，図 4-8 (C) に元素マッピング像を重ね合わせたものである。Ca の元素マッピングより，粘膜固有層に骨組織由来の 60 count 以上のスポットが確認された。また，鼻中隔の両端はその内部よりも 10 count 程度高くなった。他の 5 元素の元素マッピングでも，同じような傾向が見られた。Fe, Cu, Zn, Br の元素マッピングでは，嗅上皮の鼻腔側と粘膜固有層で高いカウント値を示し，対照群よりも 5 count 程度大きくなった。特に粘膜固有層では，免疫染色像で見られる嗅神経束が赤く染まっている部分で，カウント値の増加が見られた。一方，Ni の元素マッピングでは，嗅粘膜のどの部位においてもカウント値はほぼ得られなかった。

4.4.3.3 嗅球における元素マッピング

図 4-10 は，対照群のマウスの嗅球である。免疫染色像に見られる赤いスポット

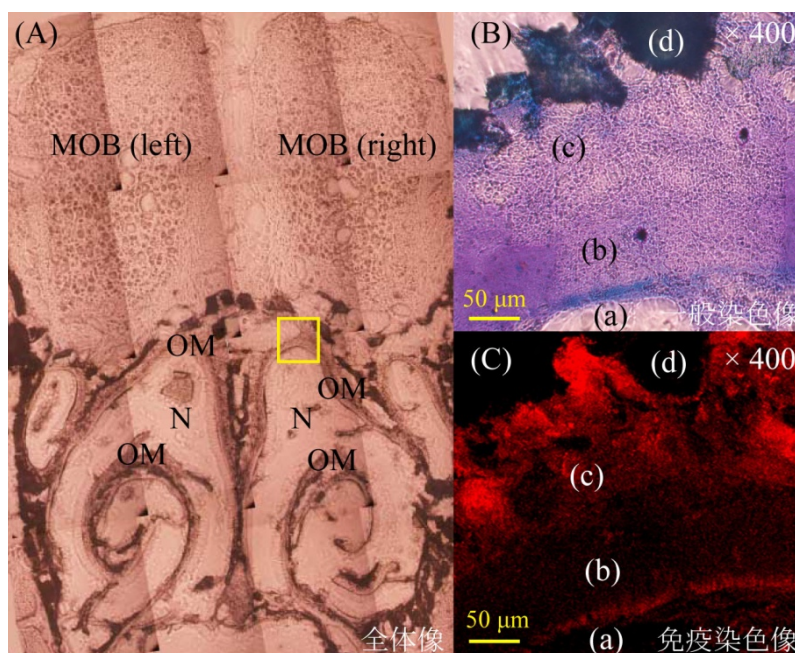


図 4-6 対照群の嗅粘膜における元素マッピング部位（黄枠内）とその部位の染色像（倍率 400 倍） (A)：切片全体の光学顕微鏡像，(B)：嗅粘膜の一般染色像，(C)：NeuN による嗅粘膜の免疫染色像 (a) 鼻腔，(b) 嗅上皮，(c) 粘膜固有層，(d) 篩板 (略字) MOB：嗅球，OM：嗅粘膜，N：鼻腔

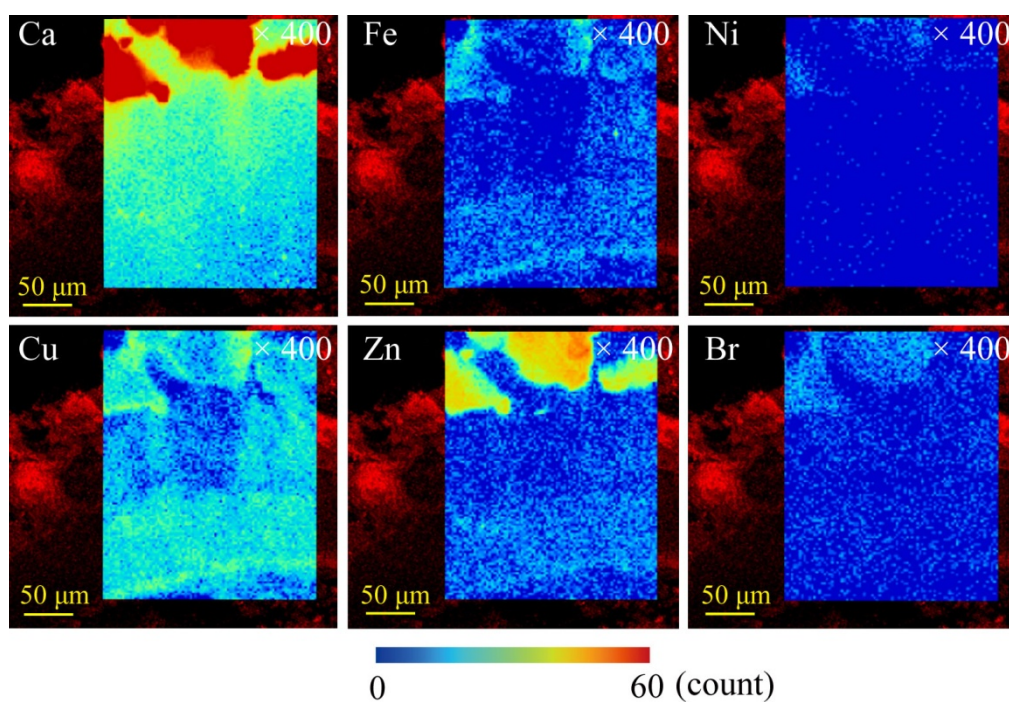


図 4-7 対照群の嗅粘膜における Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br の元素マッピング像と免疫染色像との重ね合わせ像（倍率 400 倍）

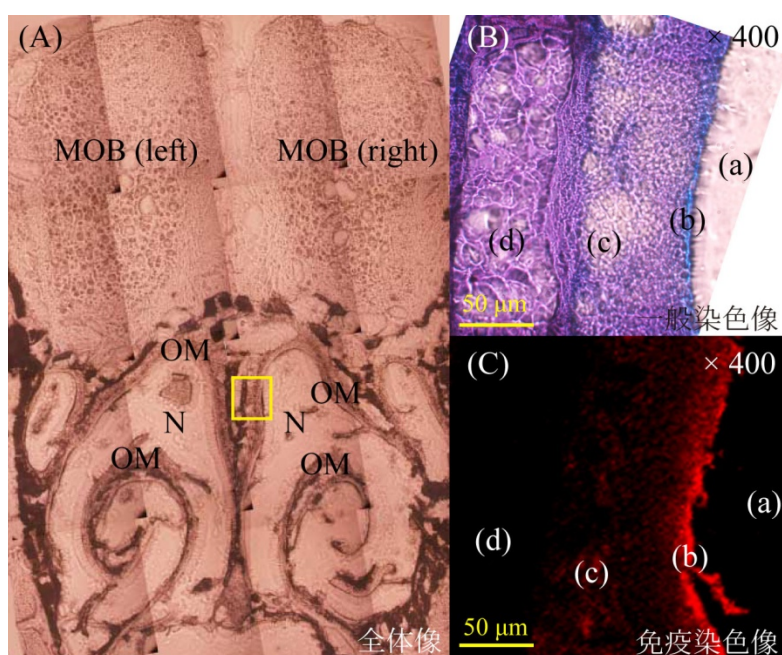


図 4-8 曝露群の嗅粘膜における元素マッピング部位（黄枠内）とその部位の染色像（倍率 400 倍），（A）：切片全体の光学顕微鏡像，（B）：嗅粘膜の一般染色像，（C）：NeuN による嗅粘膜の免疫染色像（a）鼻腔，（b）嗅上皮，（c）粘膜固有層，（d）鼻中隔（略字） MOB：嗅球，OM：嗅粘膜，N：鼻腔

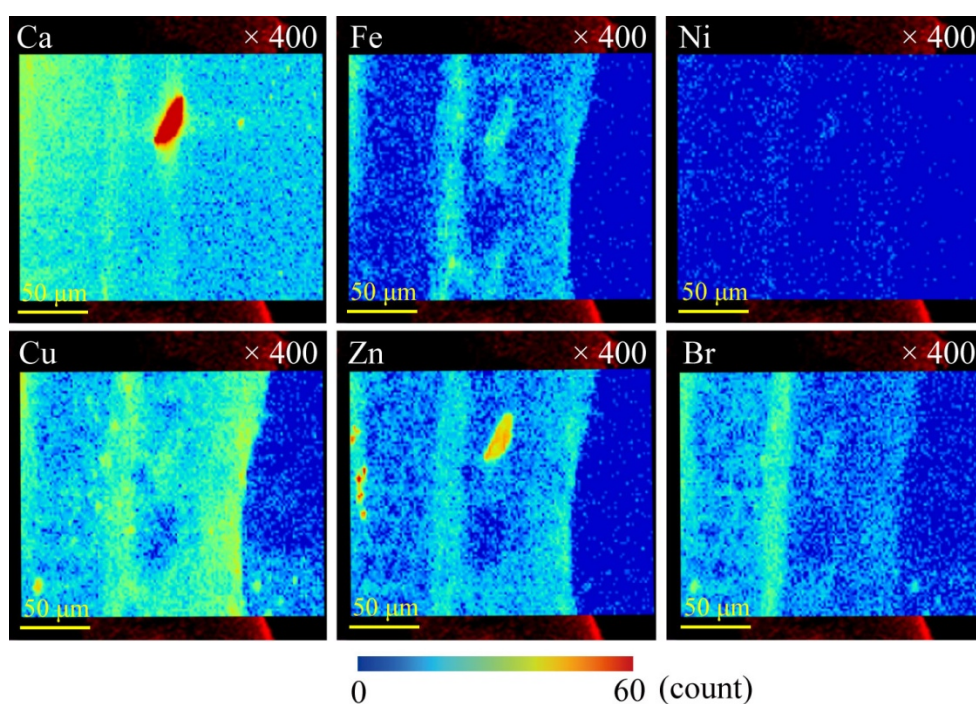


図 4-9 曝露群の嗅粘膜における Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br の元素マッピング像と免疫染色像との重ね合わせ像（倍率 400 倍）

が現れている部位が糸球体層である。嗅神経層は免疫染色によりほとんど染まらなかった。一般染色像では、糸球体層が濃い紫色に染まった。この層より右側が嗅神経層、左側が外叢状層である。

図 4-11 は、図 4-10 の (C) に元素マッピング像を重ね合わせた図である。Ca, Fe, Zn の元素マッピングでは、60 count 以上のスポットが嗅球内に点在した。Fe, Cu, Zn, Br の元素マッピングでは、嗅神経層の方が糸球体層よりもやや高いカウント値を示した。また、Cu の元素マッピングでは、嗅神経層および糸球体層で 25 count 以上の値を示した。一方、Ni の元素マッピングでは、全ての領域でカウント値がほとんど得られなかった。

図 4-12 は、曝露群のマウスの嗅球である。一般染色像では、2 層の濃い紫色に染まった細胞層が確認された。左側が顆粒細胞層、右側が糸球体層である。その間の薄く青色に染まった層が外叢上層である。免疫染色像では、顆粒細胞層が赤く鮮明に染まっており、その周りを囲むように僧帽細胞層が薄い赤色の層を形成している。糸球体層も赤いスポットが層状に存在した。糸球体層の右側は本来、嗅神経層が存在しているが、切片を作成する上で嗅神経層の一部が欠けてしまったため、嗅神経層がわずかに残った状態となった。

図 4-13 は、図 4-12 (C) に元素マッピング像を重ね合わせた図である。Ca の元素マッピングでは、組織の存在しない部分でも 15~20 count が検出され、糸球体層とほとんど変わらなかった。対照群と比較すると、対照群の糸球体層の方がカウント値が高くなった。また、内叢状層から顆粒細胞層にかけて、垂直方向にカウント値が高い領域が現れた。Zn の元素マッピングでも、同様の部位でカウント値の増加が確認された。Br の元素マッピングでは、マッピング像全体で約 20 count のスポットが点在した。また、糸球体層より右側の組織の存在しない部分でも同じようなスポットが存在した。Fe, Cu の元素マッピングでは、全体的にほぼ様なカウント値が得られ、対照群とほとんど差は見られなかった。Ni の元素マッピングでは、ほとんどカウント値が得られなかった。

4.4.4 考察

DEPを捕集したフィルターのSR-XRFでは、Ca, Fe, Cu, Znが検出された。これらの元素は過去に報告されたDEP組成分析でも検出されている^{4,6}。しかし、4.3でDEPより検出されたNa, Ca, Ti, Ni, Znとは異なる結果となった。この理由として、(1) 測定手法の違い、(2) 試料の前処理の違い、(3) 測定感度の違いが挙げられる。特に (2) に関しては、SR-XRFでは試料の前処理が必要なく、フィルター中のDEPを直接分析することができるが、ICP-MSでの定量分析ではフィルターを湿式分解してDEPを溶解する必要がある。したがって、SR-XRFでは試料の前処理に伴うコンタミの恐れがなく、DEP中に含まれる元素をより正確に検出していると考えられる。

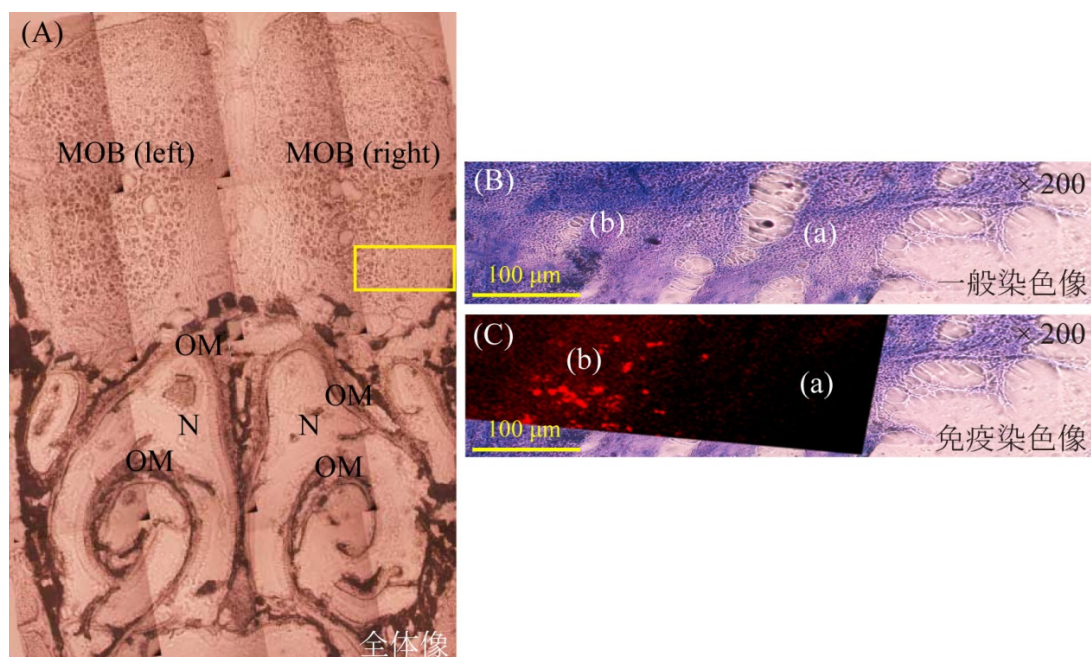


図 4-10 対照群の嗅球における元素マッピング部位（黄枠内）とその部位の染色像（倍率 200 倍） (A)：切片全体の光学顕微鏡像，
(B)：嗅球の一般染色像，(C)：NeuN による嗅球の免疫染色像，
(a) 嗅神経層，(b) 糸球体層
(略字) MOB：嗅球，OM：嗅粘膜，N：鼻腔

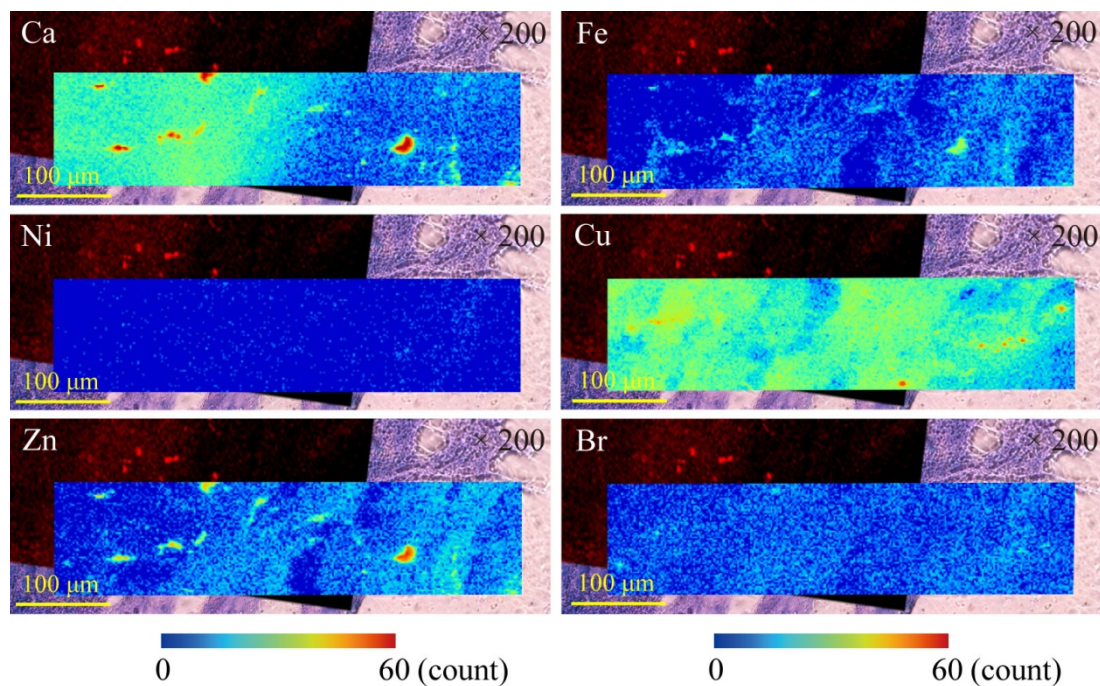


図 4-11 対照群の嗅球における Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br の元素マッピング像と免疫染色像との重ね合わせ像（倍率 200 倍）

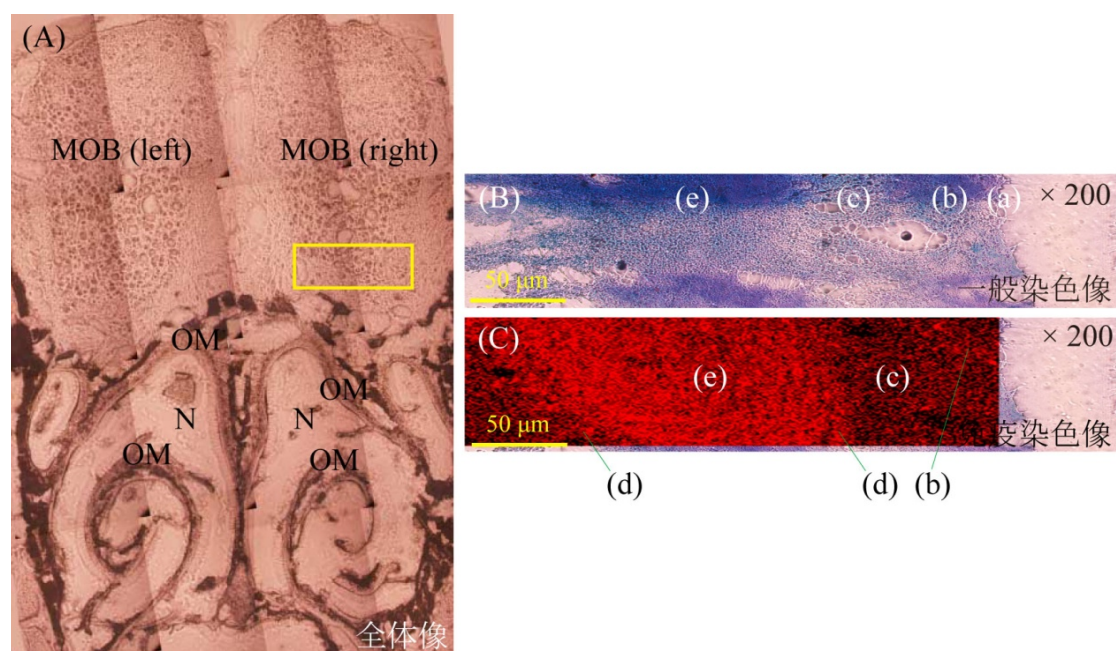


図 4-12 曝露群の嗅球における元素マッピング部位（黄枠内）とその部位の染色像（倍率 200 倍） (A)：切片全体の光学顕微鏡像，(B)：嗅球の一般染色像，(C)：NeuN による嗅球の免疫染色像 (a) 嗅神経層，(b) 糸球体層，(c) 外叢状層，(d) 内叢状層，(e) 顆粒細胞層（略字）MOB：嗅球，OM：嗅粘膜，N：鼻腔

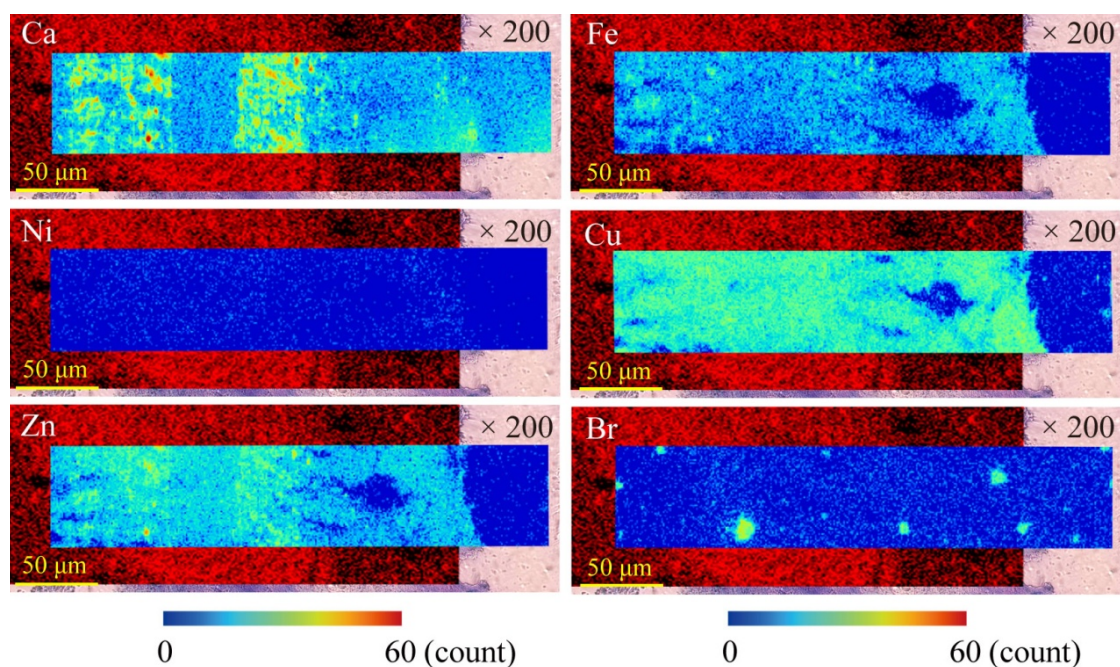


図 4-13 曝露群の嗅球における Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br の元素マッピング像と免疫染色像との重ね合わせ像（倍率 200 倍）

嗅粘膜の元素マッピングでは、曝露群の嗅上皮の粘膜層近傍で、Fe, Cu, Zn, Brでカウント値の増加が見られた。この部位は成熟した嗅神経の細胞体が存在する部位である¹¹。また、嗅神経束が存在する粘膜固有層においても、これら4元素のカウント値は対照群よりも高くなった。したがって、DEPが嗅神経内に侵入し、一部は細胞体で蓄積し、一部は軸索輸送により嗅球へ移行した可能性がある。

Caは骨組織の主成分であるため、篩板などの頭蓋骨を元素マッピングした場合、その部位で60 count以上の高いカウント値が検出された。一方、骨組織が存在しない嗅球においても、Caの元素マッピングで60 count以上のスポットが検出された。特に、曝露群の嗅球では顆粒細胞層で骨組織由来と考えられるCaとZnのカウント値の増加が見られた。本実験では、凍結切片法により嗅粘膜および嗅球の切片を骨ごとスライスして作成したため、その骨の破片が散在してしまい、元素マッピングに影響を及ぼしたことが考えられる。これを防ぐには、切片を作成する際、予め頭蓋骨を剥離した後に切片を作成するなどの工夫が必要となる。

Niは生体内にはほぼ存在せず、対照群の元素マッピングでも、Niはほとんど検出されなかった。しかし、曝露群でも対照群と同様にNiはほとんど検出されなかった。この理由として、DEPに含まれる量が少なく、組織内での検出ができなかったことが考えられる。表4-2より、DEP中ではNiが0.21 ng/g検出されたが、この重量濃度はCaの重量濃度（34.9 ng/g）やZnの重量濃度（23.6 ng/g）と比べて非常に少ない。また、DEP捕集フィルターのSR-XRFではNiのピークが検出されなかったことから、Niは検出が困難であったことが考えられる。

嗅球の元素マッピングでは、6元素ともに対照群と曝露群で糸球体層のカウント値に顕著な違いは見られなかった。DEPが嗅神経に侵入した場合、その投射先である糸球体層に到達すると考えられる。しかし、嗅神経束が存在する嗅粘膜の粘膜固有層ではFe, Cu, Zn, Brの増加が観察されたものの、嗅球の糸球体層での増加は認められなかった。このことから、今回元素マッピングを行った嗅球の部位が、元素マッピングを行った嗅粘膜の部位に存在する嗅神経の投射部位とは異なっていたことが考えられる。これはDEPの嗅粘膜への沈着が局所的であった可能性を示唆している。この場合、嗅神経のZone-to-zone projectionの構造（図3-4）から、DEPが移行した糸球体層を元素マッピングしなければ、DEPは検出できない。SR-XRFでの元素マッピング領域は非常に限られるため、ナノ粒子の嗅球への投射部位をあらかじめ把握しておく必要がある。

Brの嗅球の元素マッピングでは、組織の存在しない部分で約20 countのスポットが存在した。また、Caの元素マッピングでも、嗅粘膜および嗅球の組織の存在しない部分で15~20 countを示した。これは切片を貼り付けた粘着フィルムに、免疫染色液に含まれるCaやBrが付着して検出されたと考えられる。実際に免疫染色液をSR-XRFで定性分析したところ、CaおよびBrが検出された。したがって、CaとBrは免疫染色液の付着によりバックグラウンドが高くなり、元素マッ

ピング領域全体で検出された可能性が高い。

本実験では、重量濃度が 0.1 mg/m^3 のディーゼル排気を 4 週間吸入曝露した。一般大気中のナノ粒子の重量濃度は $0.5 \sim 2 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ であることから¹²、今回曝露したDEPの重量濃度は一般大気中の濃度よりも 50～200 倍大きい。また、マウスの呼吸量は約 $0.05 \text{ m}^3/\text{day}$ であることから、4 週間継続して 0.1 mg/m^3 のディーゼル排気を曝露した場合、吸入したDEP重量は 0.14 mg と推算される。したがって、曝露したDEP重量はSR-XRFで十分に検出できるレベルである。しかし、DEP中に含まれる金属成分は約 1% であることや³、鼻腔に侵入したDEPはクリアランスを受けることを考慮すると、嗅球へ移行したDEPを検出することは困難であった可能性がある。これらの可能性より、本実験では吸入曝露したDEPが嗅球では確認されなかった。

4.5 DEP を点鼻投与したマウスの嗅粘膜および嗅球のイメージング

4.5.1 はじめに

DEP吸入曝露実験では、曝露群の嗅球においてDEPが確認されなかった。この理由の一つに、嗅球へ移行したDEP量が少なく、元素マッピングにより検出できなかったことが考えられる。そこで本実験では、DEPの懸濁液を作成し、マウスの左鼻に点鼻投与した。これにより、高濃度のDEPを一度に曝露し、DEPの嗅球への移行をSR-XRFを用いた元素マッピングにて検討した。Oberdorsterらは、 ^{13}C ナノ粒子（粒径 36 nm ）の吸入曝露実験で、曝露から 1 日後に嗅球中の ^{13}C 量が最大となることを報告した¹³。この結果に基づき、本実験でも点鼻投与から 24 時間後にマウスを解剖した。凍結切片法により切片を作成し、SR-XRFにより元素マッピングを行った。元素マッピング後に免疫染色および一般染色を行い、免疫染色像と元素マッピング像を重ね合わせることで、嗅粘膜および嗅球におけるDEP付着元素の局在を観察した。

本実験では元素マッピングに加えて、Zn の XAFS 分析を行った。XAFS 分析を行うことで Zn の化学結合状態を確認でき、生体に元々存在する Zn と DEP に付着した Zn の化学結合状態を区別することができる。そこで、嗅球における Zn の元素マッピングにより高いカウント値を示した部位において、Zn の XAFS 分析を行った。この部位の Zn の化学結合状態が嗅球由来の Zn の化学結合状態ではなく、DEP の化学結合状態と一致すれば、DEP が嗅球へ移行したことを裏付けることができる。本実験では、対照群および曝露群の嗅球における XAFS 分析により得られた Zn の XAFS スペクトルと、DEP 懸濁液の Zn の XAFS スペクトルを比較した。また、各 XAFS スペクトルから Zn の化学結合状態を解析して比較した。これらの比較により、嗅球での Zn の局在が DEP によるものかを検討した。

4.5.2 実験方法

4.5.2.1 投与試料の作成

国立環境研究所のナノ粒子曝露棟にて、DEP (粒径 40 nm, 重量濃度 0.1 mg/m^3) をフィルターに 0.6 mg 捕集した。このフィルターを生理食塩水 5 mL 中に入れ、超音波攪拌器 (UR-20P, TOMY 社製) で十分に攪拌した。さらに、超音波発生器 (UD-201, TOMY 社製) に入れ、5 分間攪拌した。得られた DEP 懸濁液を、点鼻投与液とした (図 4-14)。

4.5.2.2 DEP 懸濁液の点鼻投与と切片の作成

本実験では、BALB/c マウス (雄, 10 週齢) を 3 匹用いた。実験群は、対照群 (1 匹), DEP 曝露群 (2 匹) の 2 群とした。はじめに、ネンブタール (5 mg/mL) を $350 \text{ }\mu\text{L}$ 腹腔内注射し、麻酔をかけた。曝露群のマウスに、4.5.2.1 で作成した DEP 懸濁液をマウスの左鼻に $10 \text{ }\mu\text{L}$ 投与した。対照群のマウスには何も投与は行わなかった。投与から 24 時間後に、灌流固定を行った。0.2%ヘパリン含有生理食塩水 30 mL で灌流した後、4%ホルムアルデヒド溶液 50 mL で固定した。灌流固定後、30 分間静置した後、マウスを解剖した。断頭後に、頭蓋骨を剥がした頭部を 4%ホルムアルデヒド溶液に入れ、 4°C で 1 晩浸漬固定した。翌日、頭部を 25%スクロース溶液に入れ、 4°C で 1 日間浸透させた。浸透後、頭部を凍結組織包埋剤 (O.C.T. Compound, Tissue-Tek 社製) で満たしたステンレス製包埋容器に入れ、容器をドライアイスで冷却したヘキサン (約 -75°C) 中に入れて頭部を凍結包埋した。

凍結包埋した頭部を、川本法を用いた凍結切片法により切片を作成した¹⁰。クライオスタット (CM3050S, Leica社製) を用いて冠状面の切片を作成した。面出しをした後、粘着フィルム (Cryofilm Type II・C, Leica社製) を凍結ブロックの表面に貼り付け、薄切した。切片は嗅粘膜、嗅球のそれぞれの部位で作成した。各切片の厚さは $30 \text{ }\mu\text{m}$ とした。切片が貼り付いた粘着フィルムを、アクリル板の中心部に円形の穴を開けた基材に静置し、風乾させたものを最終試料とした。



図 4-14 DEP 懸濁液の作成

(a) 超音波攪拌器による DEP 捕集フィルターの攪拌, (b) 超音波発生器による生理食塩水の中での DEP 捕集フィルターの攪拌, (c) 作成した DEP 懸濁液

4.5.2.3 SR-XRF を用いた元素マッピング

SPring-8 のビームライン BL37XU にて、SR-XRF を用いた元素マッピングを行った（図 4-4）。元素マッピングは、設定した四角形の領域の左下から開始し、右方向へとビームを 1.5 μm ずつ移動させた。右端まで移動すると、1 μm 上に移動し、また左端から右端へと移動させた。1 点のビームの照射時間を試料中の濃度に応じて 0.5 秒もしくは 1 秒とした。使用したビームのエネルギーは 10 keV、ビームサイズは 1.5（水平方向） \times 0.7（垂直方向） μm^2 に調整した。検出器に取り付けられた 7 個のチャンネルの内、6 個を元素マッピング用のチャンネルとし、残りの 1 個を励起された総 X 線のカウンタ値検出用のチャンネルとした。はじめに、元素マッピング対象元素の選定を行った。DEP 懸濁液をプロレンフィルム上に滴下し、風乾させた試料の SR-XRF を行った。得られた蛍光 X 線スペクトルより高いカウンタ値を示した元素を中心に、Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn を元素マッピング対象元素とした。

4.5.2.4 XAFS 分析

元素マッピング終了後、対照群と曝露群の嗅球における XAFS 分析を行った。対象元素は Zn とした。対照群、曝露群ともに、SR-XRF により得られた Zn の元素マッピング像の中で、高いカウンタ値を示した部位を XAFS 分析対象位置とした。Zn の吸収端エネルギー（9660 eV）より、照射するビームのエネルギー範囲を 9640～9690 eV とし、吸収端近傍（XANES）の領域の解析を行った。また、Zn の標準試料として Zn, ZnO, ZnO₂, ZnSO₄, Zn₃(PO₄)₂, Zn(NO₃)₂・6H₂O のペレットを作成し、それぞれ XAFS 分析を行った。測定後、XAFS 解析統合ソフトウェア（REX2000, リガク社製）を用いて、XAFS スペクトルの解析を行った。REX2000 の解析ツールであるパターンフィッティングを用いて、対照群と曝露群の嗅球から得られた XAFS スペクトルから各嗅球に含まれる Zn の化学結合状態を解析した。また、DEP 懸濁液の XAFS 分析を行い、パターンフィッティングにより DEP に含まれる Zn の化学結合状態を解析した。DEP に含まれる Zn の化学結合状態と、対照群および曝露群の嗅球に含まれる Zn の化学結合状態を比較し、曝露群の嗅球で観察された Zn の局在が DEP 由来の Zn であるかを検討した。

4.5.2.5 画像処理

元素マッピングにより得られたカウンタ値を虹色のグラデーションで表した。元素毎にグラデーションのコントラストが最適となるようグラデーションの範囲を設定した。そのグラデーションの範囲を、Ca(0～2000 count), Mn(0～30 count), Fe(0～400 count), Ni(0～10 count), Cu(0～300 count), Zn(0～400 count) とした。最大値を超える値は全て赤色で表示した。

4.5.2.6 免疫染色とクリューバー・バレラ染色

元素マッピング後，試料が付着した粘着フィルムをスライドグラスに載せ，免疫染色を行った。PBS で 5 分間×3 回洗浄した後，切片の周りにリキッドブローカーを塗布した。ブロッキング液（表 4-5）を 300 μ L 滴下し，1 時間室温で遮光して静置した。その後，ブロッキング液を除去し，一次抗体（表 4-5）を 120 μ L 滴下し，1 晩 4°C で遮光して静置した。これを，PBS で 5 分間×3 回洗浄した後，二次抗体（表 4-5）を 120 μ L 滴下し，3 時間室温で遮光して静置した。さらに，PBS で 5 分間×3 回洗浄し，染色を完了した。これらの切片を，共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。観察後，クリューバー・バレラ染色を行った。実験手順は 4.4.2.6 と同様である。染色完了後，光学顕微鏡で切片を観察した。

4.5.3 結果

4.5.3.1 SR-XRF による DEP 懸濁液の組成分析

図 4-15 に，DEP 懸濁液の SR-XRF により得られた蛍光 X 線スペクトルを示す。横軸は検出された蛍光 X 線のエネルギー（keV），縦軸は 1 秒間当たりのカウント値（CPS）である。図中のスペクトルは，DEP 懸濁液の SR-XRF で得られた CPS からプロレンフィルムのみの SR-XRF で得られた CPS を減じた後のスペクトルである。このスペクトルから，Ge, Ar, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn が検出された。これらの元素の内，Ar は大気中に存在することにより，Ge は半導体検出器の分光結晶に使用されていることにより検出されたバックグラウンドである。したがって，DEP 懸濁液からは Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn が検出された。これらの元素から，Mn, Fe, Ni, Cu, Zn を元素マッピングの対象元素とした。残り 1 元素は，骨組織（篩板）検出用として Ca とした。

表 4-5 ブロッキング液，一次抗体および二次抗体の作成方法

溶液	溶液の組成と作成方法
ブロッキング液	1% BSA (Bovine Serum Albumin) 0.3% Triton-X100 0.5% NaN ₃ *上記の濃度で 10mM PBS 中に添加
一次抗体	OMP (Olfactory Marker Protein, ホスト:Goat) *ブロッキング液で 1000 倍に希釈
二次抗体	Alexa Fluor 488 (Anti-Goat IgG Antibodies, ホスト:Rabbit) *ブロッキング液で 1000 倍に希釈

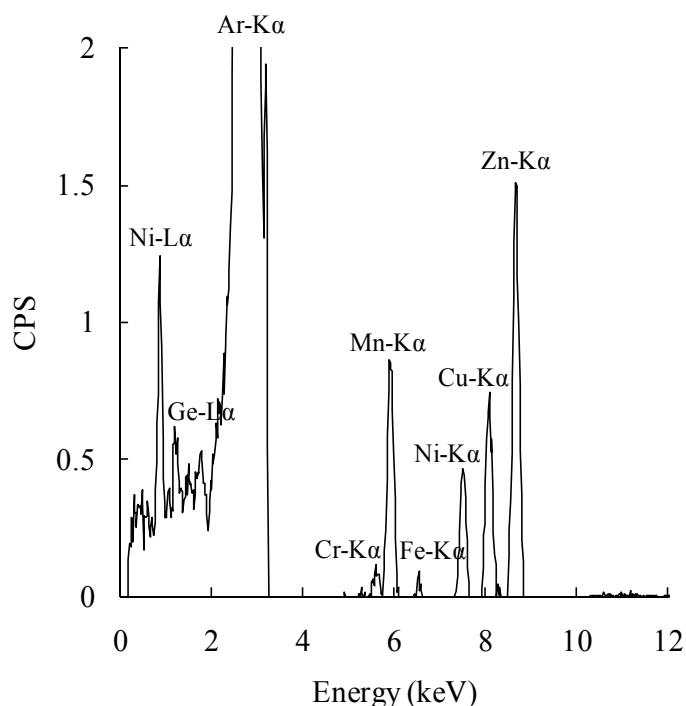


図 4-15 SR-XRF による DEP の蛍光 X 線スペクトル

横軸：励起エネルギー (keV)，縦軸：1 秒間あたりに得られたカウント値 (CPS)

4.5.3.2 嗅粘膜における元素マッピング

図 4-16 に、対照群のマウスの嗅粘膜における元素マッピング部位（黄枠内）を示した図と、その部位の染色像を示す。(A) は光学顕微鏡による切片の全体像に、元素マッピング部位（黄枠内）を記した図で、(B) はその部位を拡大して撮像した図である。(C) はクリューバー・バレー染色後に光学顕微鏡で撮像した図（倍率 400 倍）で、(D) は OMP で嗅神経を免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡で撮像した図（倍率 400 倍）である。免疫染色像では、粘膜層、嗅上皮、粘膜固有層が確認できた。また、嗅上皮に存在する嗅神経の細胞体の輪郭が鮮明に染まっており、細胞体 1 個単位で確認することができた。一方、元素マッピングを行った部位は組織の変性により全く染まらなかった。一般染色像では、組織全体が一様に染まり、細胞層を判断することができなかった。

図 4-17 は、図 4-16 の (D) に Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn の元素マッピング像を重ね合わせた図である。Ca の元素マッピングでは、マッピング領域全体でほぼ一様なカウント値を示した。Fe, Cu, Zn の元素マッピングでは、嗅上皮で鼻腔よりも高いカウント値が得られた。Mn, Ni の元素マッピングでは鼻腔、嗅粘膜ともにカウント値はほぼ得られなかった。

図 4-18 は、曝露群の嗅粘膜における元素マッピング部位の染色像である。免疫染色像では、対照群と同様に粘膜層、嗅上皮、粘膜固有層が確認できた。また、

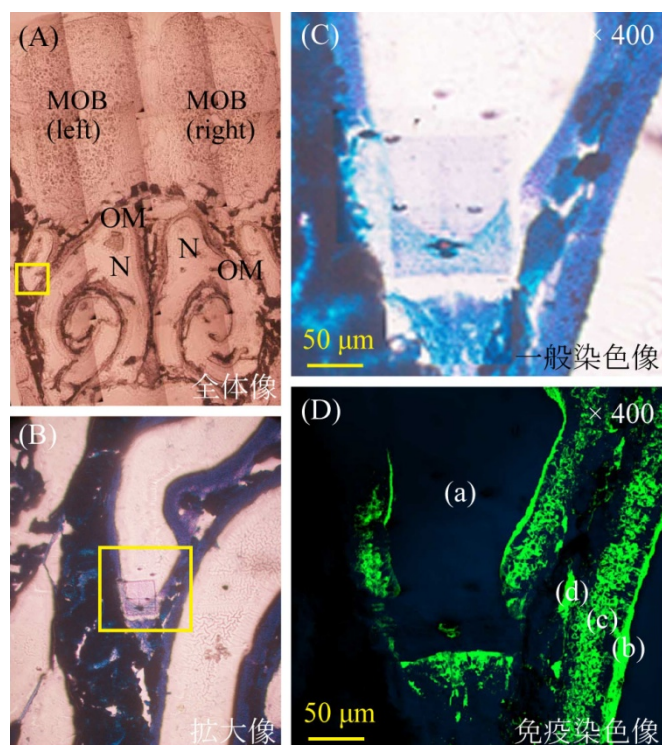


図 4-16 対照群の嗅粘膜における元素マッピング部位（黄枠内）とその染色像（倍率 400 倍） (A)：切片全体の光学顕微鏡像，(B)：元素マッピング部位の拡大像，(C)：一般染色像，(D)：免疫染色像 (a) 鼻腔，(b) 粘膜層，(c) 嗅上皮，(d) 粘膜固有層 (略字) MOB：嗅球，OM：嗅粘膜，N：鼻腔

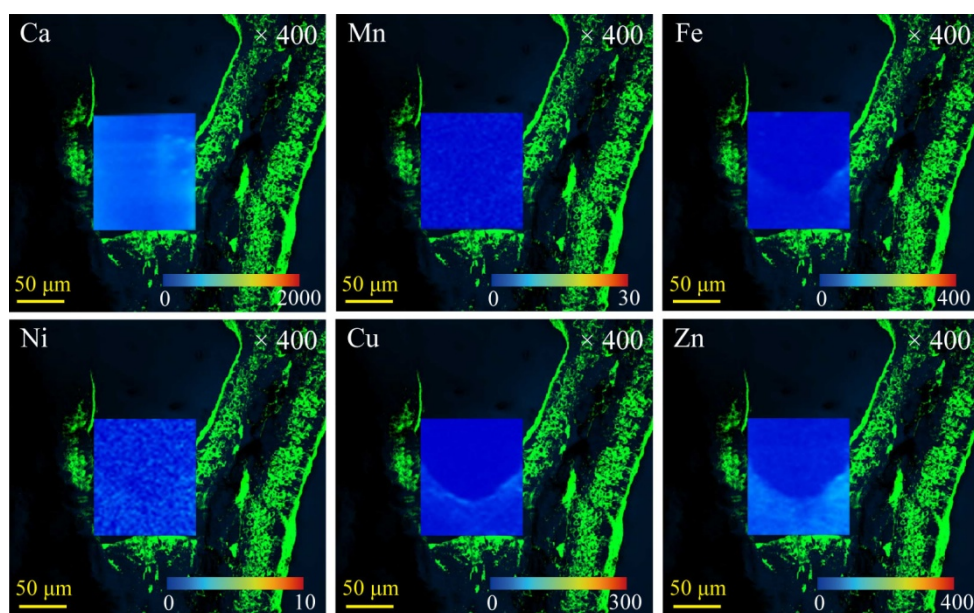


図 4-17 対照群の嗅粘膜における Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn の元素マッピング像と免疫染色像との重ね合わせ像（倍率 400 倍）

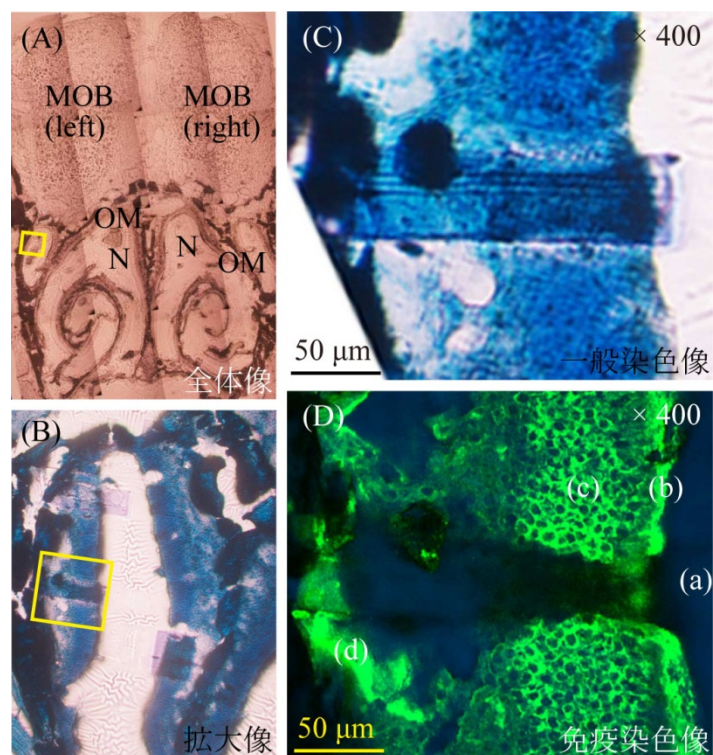


図 4-18 曝露群の嗅粘膜における元素マッピング部位（黄枠内）とその染色像（倍率 400 倍） (A)：切片全体の光学顕微鏡像，(B)：元素マッピング部位の拡大像，(C)：一般染色像，(D)：免疫染色像 (a) 鼻腔，(b) 粘膜層，(c) 嗅上皮，(d) 粘膜固有層 (略字) MOB：嗅球，OM：嗅粘膜，N：鼻腔

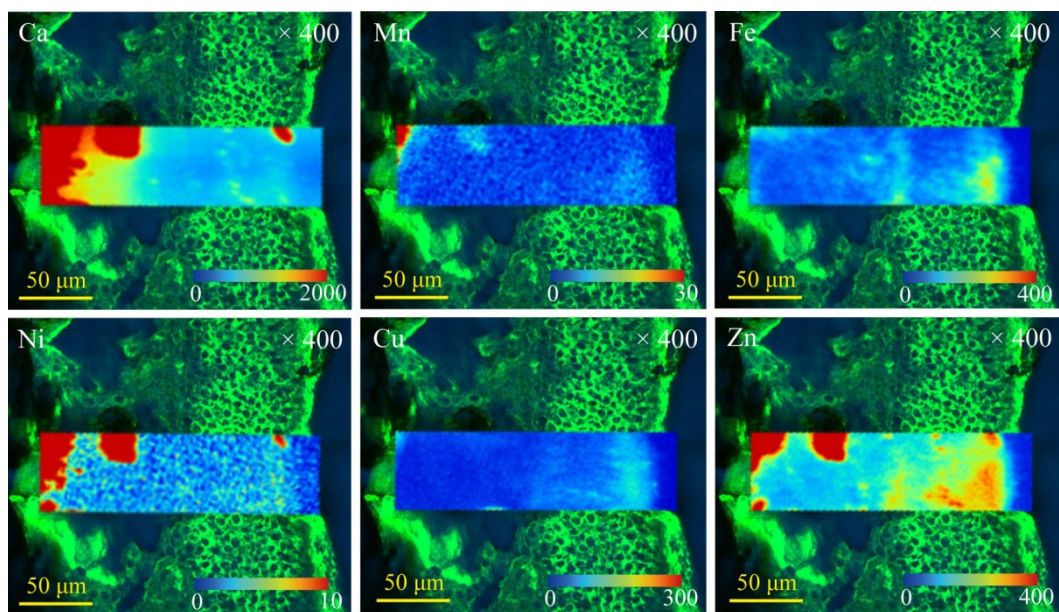


図 4-19 曝露群の嗅粘膜における Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn の元素マッピング像と免疫染色像との重ね合わせ像（倍率 400 倍）

嗅上皮に存在する嗅神経の細胞体も確認できた。一方、元素マッピングを行った部位は全く染まらなかった。一般染色像では、嗅上皮の方が粘膜固有層よりやや濃い青色で染まり、これらの細胞層を区別することができた。

図 4-19 は、図 4-18 の (D) に Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn の元素マッピング像を重ね合わせた図である。Ca の元素マッピングでは、粘膜固有層や嗅上皮の一部で、篩板由来の 2000 count を超える領域が存在した。一般染色像では、この部分が黒く観察され、篩板であることが確認できた。また、Mn, Ni, Zn の元素マッピングにおいても、同様の部位で高いカウント値が得られた。篩板以外の部位では、6 元素ともに嗅上皮で対照群よりも高いカウント値を示した。特に、Fe, Cu, Zn の元素マッピングでは、嗅神経の細胞体付近や基底膜付近でカウント値の顕著な増加が見られた。また粘膜固有層でも、基底膜近傍で高いカウント値を示す領域が存在した。一方、Ca, Mn, Ni の元素マッピングでは、篩板以外の部位ではほぼ一様なカウント値を示した。

4.5.3.3 嗅球における元素マッピング

図 4-20 は、対照群の嗅球における元素マッピング部位の染色像である。免疫染色像では、嗅神経層と糸球体層がはっきりと確認できた。特に糸球体層では、糸球体 1 個単位で確認することができた。一般染色像では、糸球体層の輪郭や、僧帽細胞層、顆粒細胞層がライン状に染まっていることが確認された。一方、元素マッピング部位は組織の変性により一般染色像、免疫染色像ともに全く染まらなかった。

図 4-21 は、図 4-20 の (D) に Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn の元素マッピング像を重ね合わせた図である。Ca の元素マッピングでは、カウント値はほとんど得られなかった。Fe, Cu, Zn の元素マッピングでは、糸球体層、僧帽細胞層、顆粒細胞層でやや高いカウント値を示した。特に Fe の元素マッピングでは、糸球体層で 400 count を超える領域が存在した。一方、Mn, Ni の元素マッピングでは、マッピング領域全体でほぼ一様なカウント値を示した。

図 4-22 は、曝露群の嗅球下部における元素マッピング部位の染色像である。免疫染色像では、対照群と同様に嗅神経層や糸球体層、および各糸球体が確認できた。一般染色像では、糸球体層と外叢状層が確認できたものの、対照群の嗅球ほど明確には染色されなかった。

図 4-23 は、図 4-22 の (D) に Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn の元素マッピング像を重ね合わせた図である。Ca, Cu, Ni, Zn の元素マッピングでは、嗅神経層および糸球体層において、対照群の嗅球では見られない高いカウント値を示すスポットが数点存在した。Fe の元素マッピングでは、対照群と同様に糸球体層で高いカウント値を示す領域が存在した。一方、Mn の元素マッピングでは、高いカウント値を示す部位はなく、対照群との明らかな差は見られなかった。

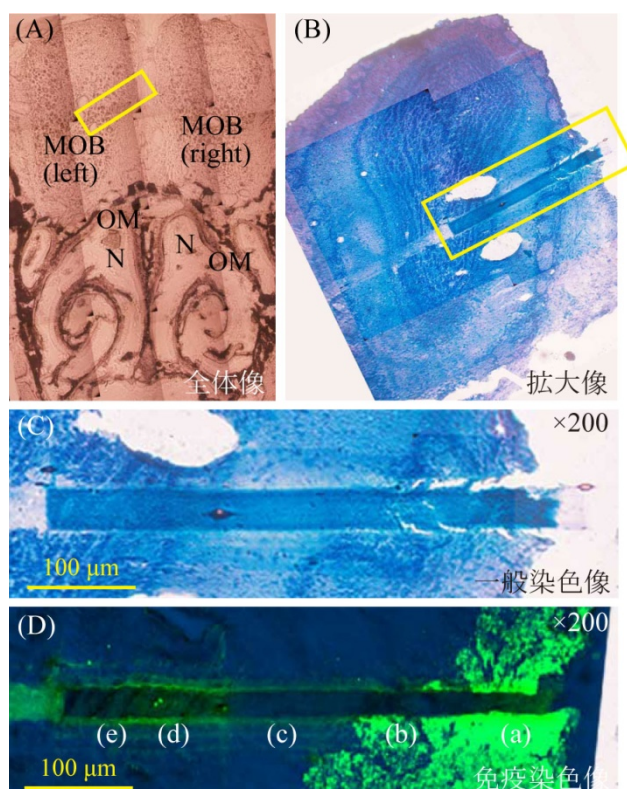


図 4-20 対照群の嗅球における元素マッピング部位（黄枠内）とその染色像（倍率 200 倍）（A）：切片全体の光学顕微鏡像，（B）：元素マッピング部位の拡大像，（C）：一般染色像，（D）：免疫染色像（a）嗅神経層，（b）糸球体層，（c）外叢状層，（d）僧帽細胞層，（e）顆粒細胞層（略字）MOB：嗅球，OM：嗅粘膜，N：鼻腔

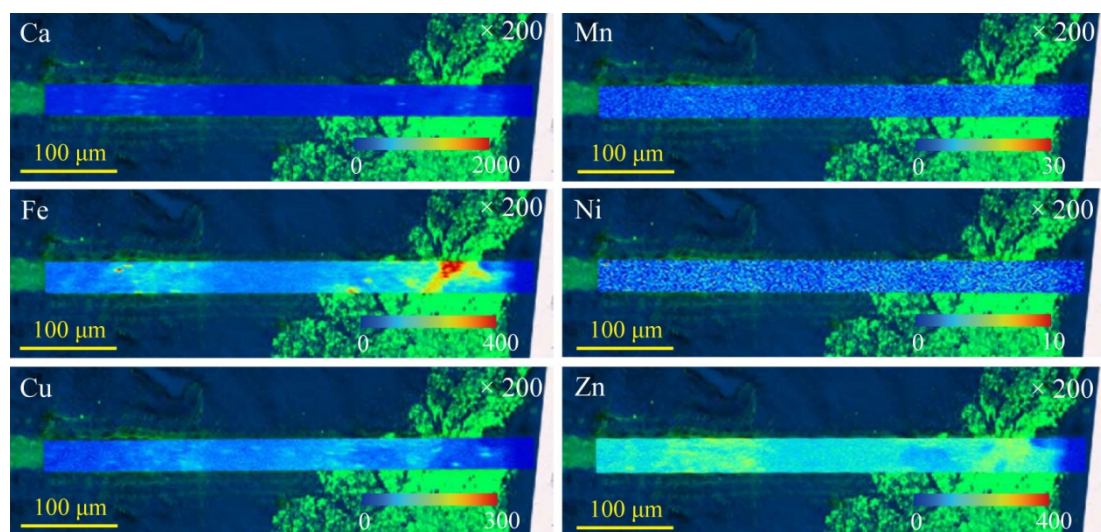


図 4-21 対照群の嗅球における Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn の元素マッピング像と免疫染色像との重ね合わせ像（倍率 200 倍）

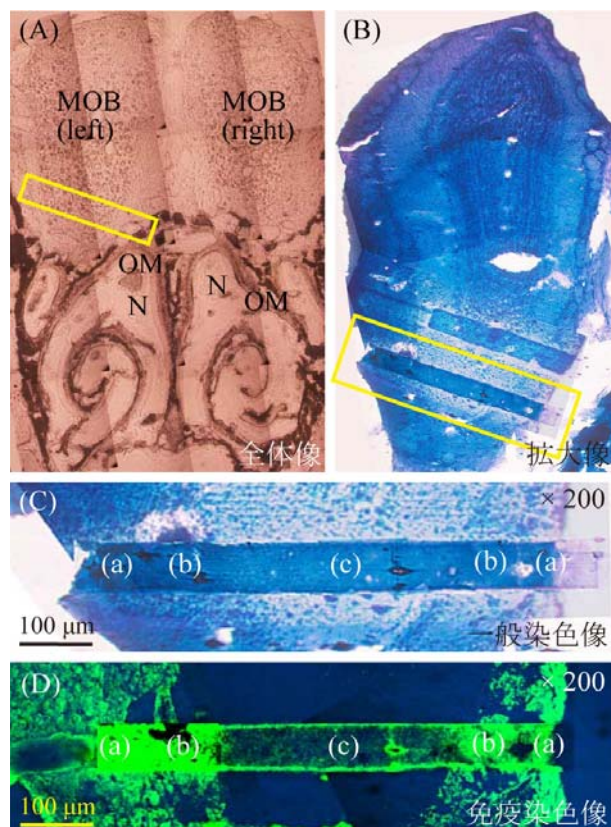


図 4-22 曝露群の嗅球下部における元素マッピング部位（黄枠内）とその染色像（倍率 200 倍） (A)：切片全体の光学顕微鏡像，(B)：元素マッピング部位の拡大像，(C)：一般染色像，(D)：免疫染色像 (a) 嗅神経層，(b) 糸球体層，(c) 外叢状層 (略字) MOB：嗅球，OM：嗅粘膜，N：鼻腔

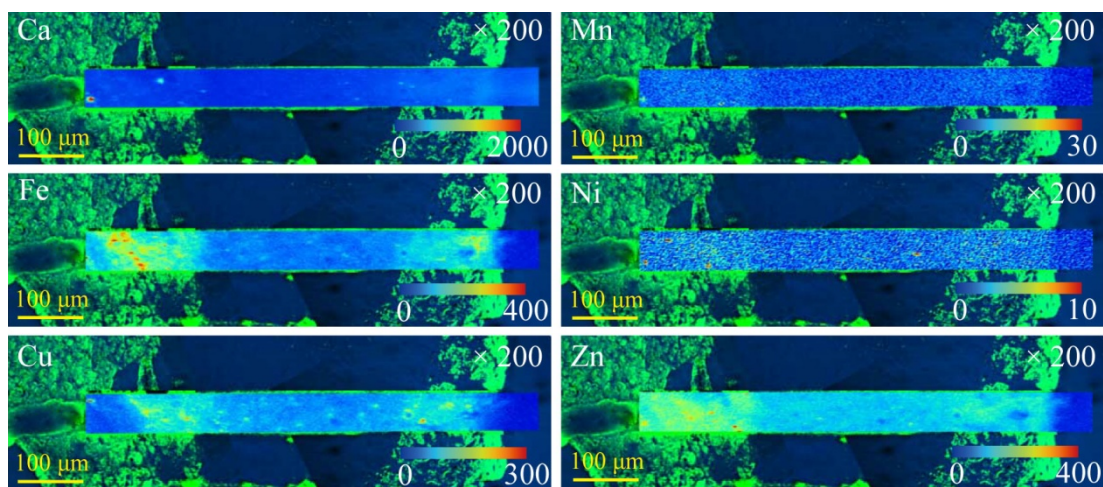


図 4-23 曝露群の嗅球下部における Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn の元素マッピング像と免疫染色像との重ね合わせ像（倍率 200 倍）

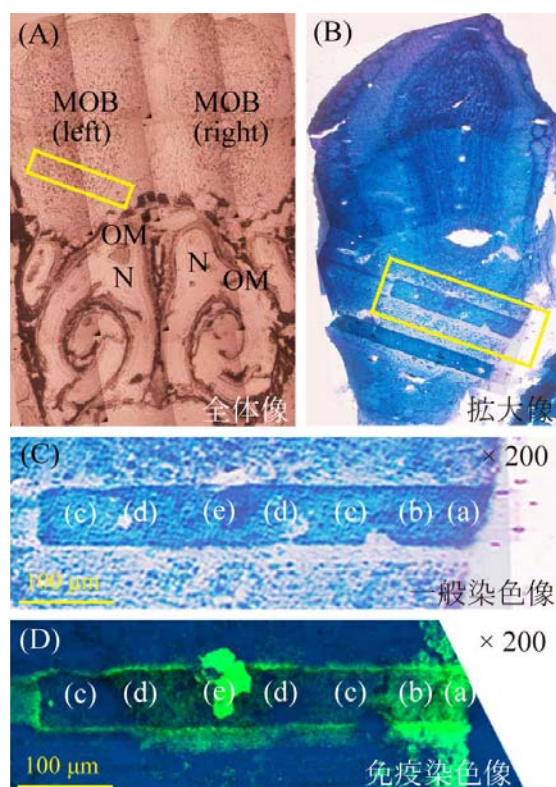


図 4-24 曝露群の嗅球中央部における元素マッピング部位（黄枠内）とその染色像（倍率 200 倍） (A)：切片全体の光学顕微鏡像，(B)：元素マッピング部位の拡大像，(C)：一般染色像，(D)：免疫染色像 (a) 嗅神経層，(b) 糸球体層，(c) 外叢状層，(d) 僧帽細胞層，(e) 顆粒細胞層 (略字) MOB：嗅球，OM：嗅粘膜，N：鼻腔

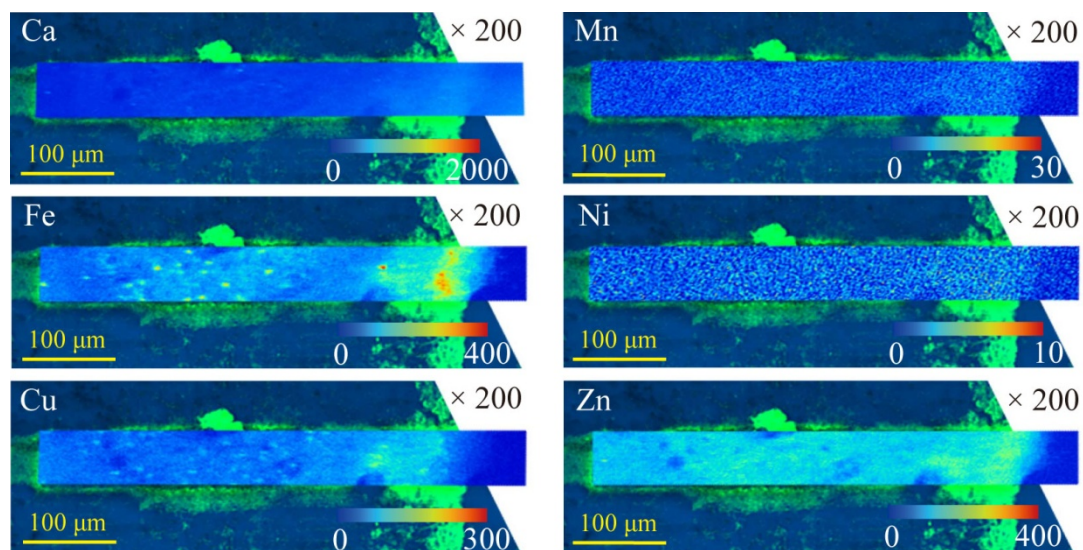


図 4-25 曝露群の嗅球中央部における Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn の元素マッピング像と免疫染色像との重ね合わせ像（倍率 200 倍）

図 4-24 は、曝露群の嗅球中央部における元素マッピング部位の染色像である。免疫染色像では、嗅神経層と糸球体層が確認できた。また、顆粒細胞層の中央にアーチファクトと考えられる輝度の高い領域が存在した。一般染色像では、糸球体層の輪郭と僧帽細胞層のラインを確認することができた。

図 4-25 は、図 4-24 の (D) に Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn の元素マッピング像を重ね合わせた図である。Ca, Cu, Ni, Zn の元素マッピングでは、図 4-23 の嗅神経層および糸球体層に存在したカウント値の高いスポットは現れず、マッピング領域全体でほぼ一様なカウント値を示した。Mn の元素マッピングでも、高いカウント値を示す部位は存在しなかった。Fe の元素マッピングでは、対照群と同様に糸球体層で高いカウント値を示す領域が存在した。

4.5.3.4 XAFS 分析

元素マッピング後、対照群および曝露群の嗅球における Zn の XAFS 分析を行った。図 4-26 に、Zn の XAFS 分析を行った位置を示す。対照群は Zn の元素マッピング像の中でカウント値が高かったスポット (a) を XAFS 分析対象位置とした。曝露群は嗅神経層および糸球体層で高いカウント値を示したスポット (b) ~ (d) と、外叢状層、僧帽細胞層、糸球体層でそれぞれカウント値が高かったスポット (e) ~ (g) を XAFS 分析対象位置とした。

図 4-27 に、DEP 懸濁液における Zn の XAFS スペクトルと、対照群と曝露群の嗅球における Zn の XAFS スペクトルを示す。横軸は照射したビームのエネルギー (eV)、縦軸は規格化した X 線の吸光度 (-) である。対照群のスポット (a) と曝露群のスポット (b) ~ (d) の XAFS スペクトルを比較すると、スペクトルの立ち上がりのエネルギー (吸収端エネルギー) が明らかに異なった。また、DEP 懸濁液とスポット (a) では吸収端エネルギーが明らかに異なるものの、DEP 懸濁液とスポット (b) ~ (d) ではほぼ等しくなった。一方、対照群のスポット (a) と曝露群のスポット (e) ~ (g) ではスペクトルの吸収端エネルギーがほぼ等しくなり、DEP 懸濁液とスポット (e) ~ (g) の吸収端のエネルギーは明らかに異なった。

図 4-28 は、DEP 懸濁液の Zn の XAFS スペクトルと Zn の標準試料 (Zn, ZnO, ZnO₂, ZnSO₄, Zn₃(PO₄)₂, Zn(NO₃)₂・6H₂O) の XAFS スペクトルである。これらのスペクトルを比較すると、DEP 懸濁液の吸収端エネルギーは Zn や Zn(NO₃)₂・6H₂O とほぼ等しく、逆に ZnO や ZnO₂ とは明らかに異なった。DEP 懸濁液の吸収端エネルギー後のスペクトルは、なだらかに減少した後ほぼ横ばいとなり、Zn, Zn₃(PO₄)₂, Zn(NO₃)₂・6H₂O のスペクトルと似た傾向を示した。

表 4-6 は、REX2000 の解析ツールであるパターンフィッティングを用いて DEP 懸濁液と嗅球の各スポットにおける Zn の化学組成の百分率を算出した結果である。DEP 懸濁液に含まれる Zn の化学結合状態は、Zn₃(PO₄)₂ が 89.5%, Zn(NO₃)₂・

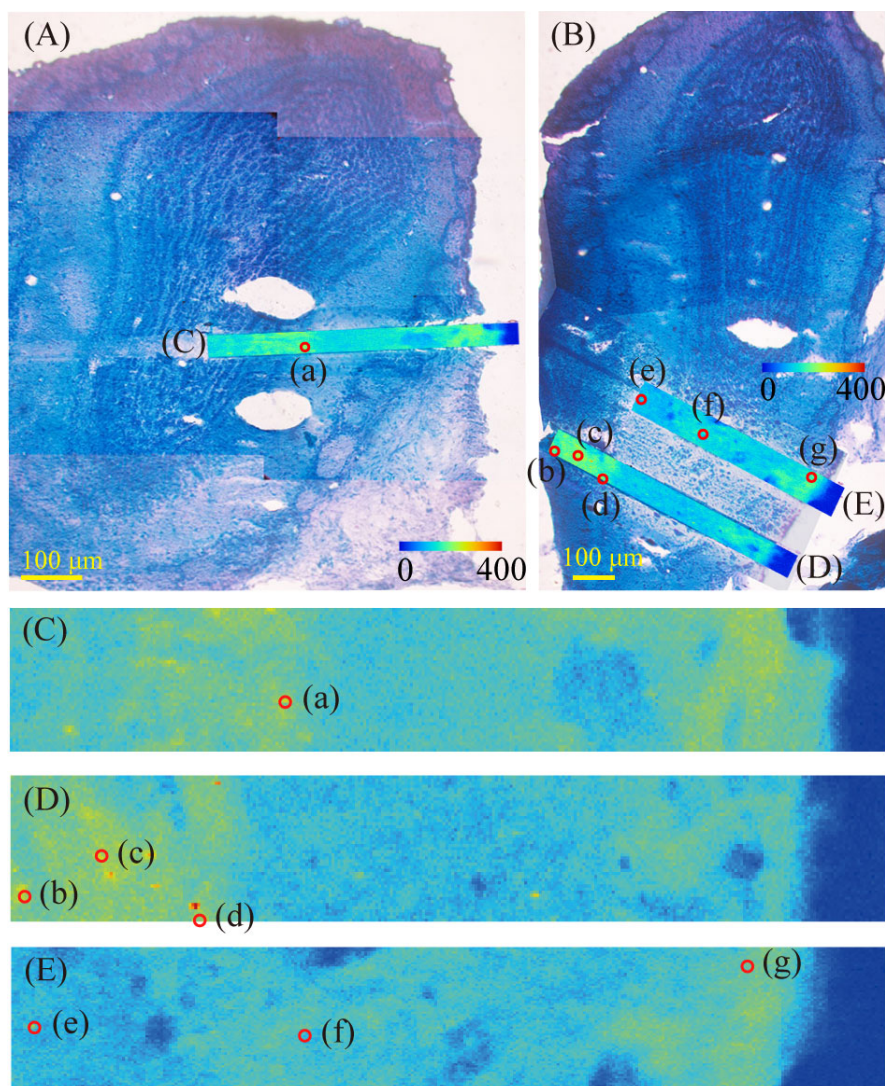


図 4-26 対照群 (A) および曝露群 (B) の嗅球の一般染色像と Zn の元素マッピング像 (C) ~ (E) の重ね合わせ像 (a) ~ (g) は XAFS 分析を行った位置

$6\text{H}_2\text{O}$ が 10.5% と算出された。対照群のスポット (a) では、Zn が 18.9%, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ が 20.6%, ZnO_2 が 60.5% と算出され、DEP 懸濁液の化学結合状態とは明らかに異なった。一方、曝露群のスポット (b) ~ (d) では、 $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ が 70% 程度となり、DEP 懸濁液に近い化学結合状態となった。特に、スポット (b) では $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ が 10.7% となり、DEP 懸濁液と非常に近い化学結合状態となった。一方、曝露群のスポット (e) ~ (g) では、Zn, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, ZnO_2 が算出され、対照群のスポット (a) と非常に近い化学結合状態となった。また、 ZnSO_4 はどのスポットからも算出されなかった。

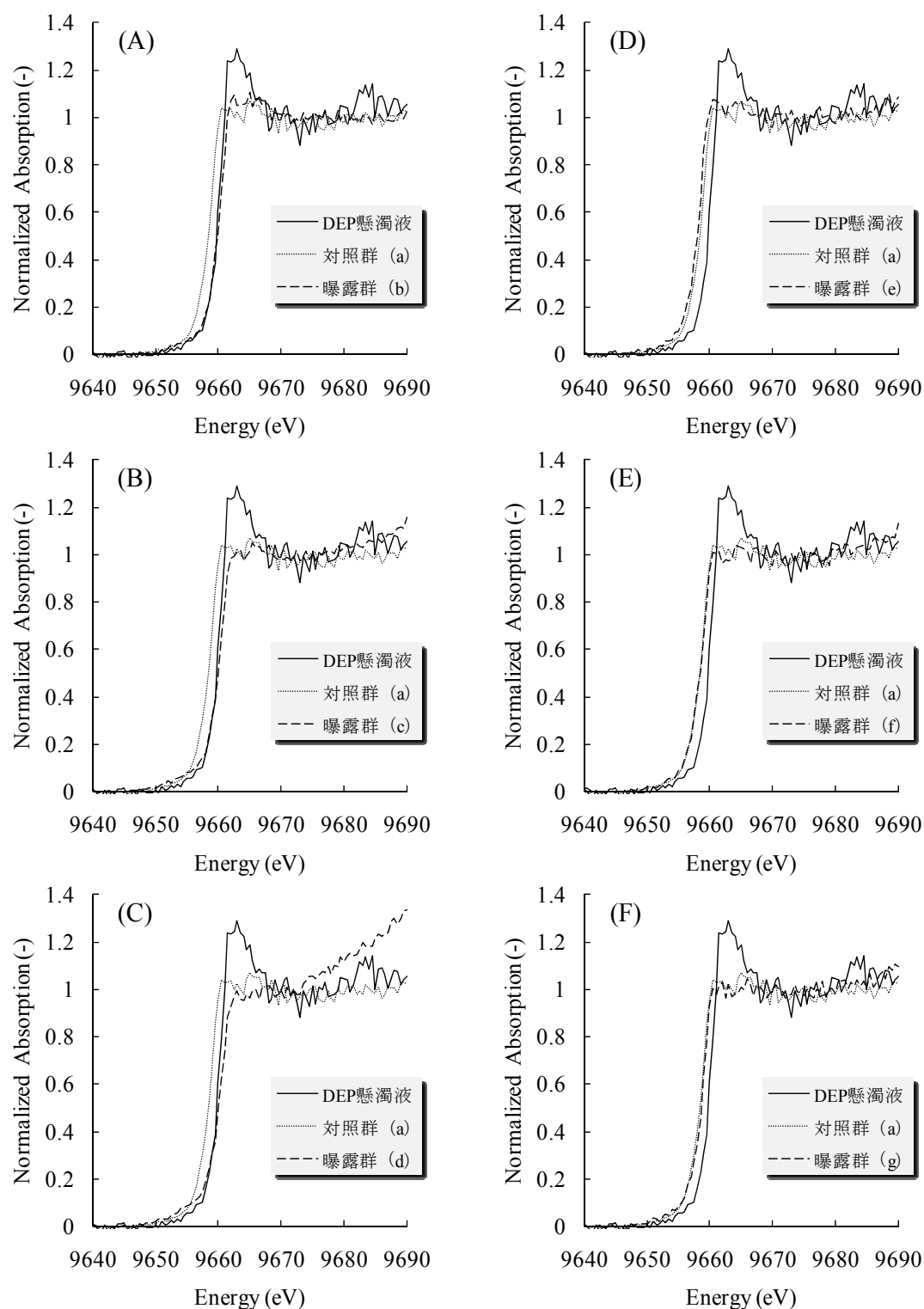


図 4-27 DEP 懸濁液と対照群，曝露群の嗅球における Zn の XAFS スペクトル
(A) ～ (F) : DEP 懸濁液，対照群の嗅球におけるスポット (a) および
曝露群の嗅球におけるスポット (b) ～ (g) の XAFS スペクトル

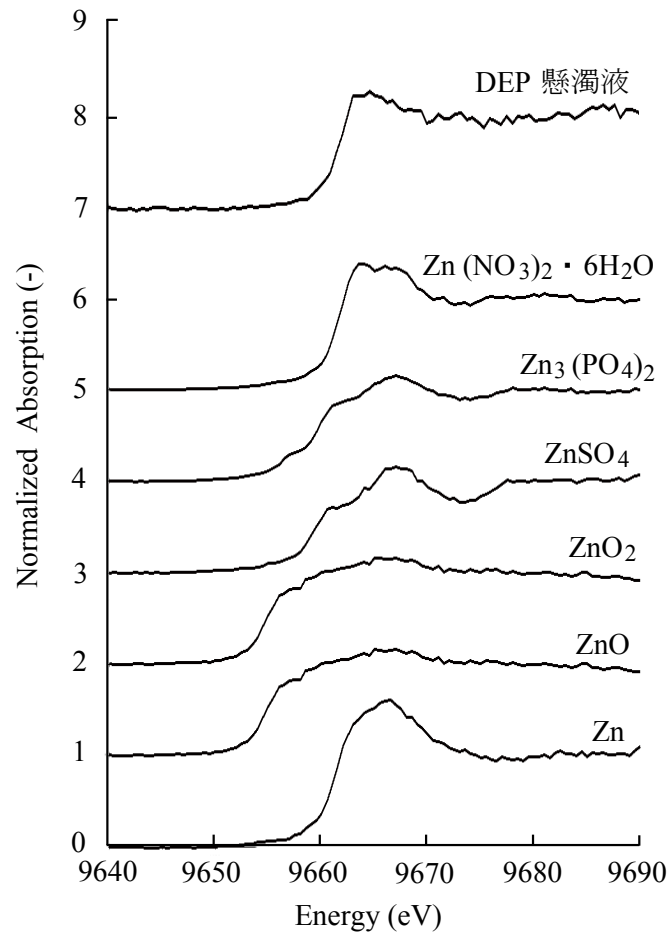


図 4-28 DEP 懸濁液と Zn 標準試料における Zn の XAFS スペクトル

表 4-6 パターンフィッティングによる DEP 懸濁液と対照群および曝露群の嗅球の XAFS スペクトルから算出された Zn の化学組成の百分率

Sample	Standard compounds					
	Zn (%)	ZnO (%)	ZnO ₂ (%)	ZnSO ₄ (%)	Zn ₃ (PO ₄) ₂ (%)	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (%)
DEP 懸濁液					89.5	10.5
対照群 (a)	18.9		60.5		20.6	
曝露群 (b)			17.7		71.6	10.7
曝露群 (c)		21.3			78.7	
曝露群 (d)		31.1			68.9	
曝露群 (e)	31.2		44.8		23.9	
曝露群 (f)	20.2		57.7		22.1	
曝露群 (g)	11.8		54.7		33.5	

4.5.4 考察

嗅粘膜における SR-XRF の元素マッピングでは、対照群と曝露群では明らかにカウント値が異なった。曝露群の嗅上皮では、粘膜層から嗅上皮にかけて、測定対象とした 6 元素 (Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn) とともにカウント値が高かった。特に, Fe, Cu, Zn の元素マッピングでは嗅神経の細胞体付近や基底膜近傍で顕著な増加が見られた。これは第 3 章の蛍光ポリスチレンナノ粒子点鼻投与実験で観察された粒子の嗅上皮内の局在部位と類似している。したがって, DEP が粘膜層に沈着した後, 一部は嗅神経内に侵入して嗅神経の細胞体で蓄積し, 一部は嗅上皮内に侵入後, 基底膜を通過できずに嗅上皮内で滞留した可能性が考えられる。

一方, 粘膜固有層では元素種によりカウント値が高い領域が異なった。Ca, Mn, Ni の元素マッピングでは, 篩板を除く粘膜固有層全体でほぼ一様のカウント値を示した。この内, Ca と Ni は対照群よりも高いカウント値を示し, Mn は対照群とほぼ変わらなかった。Fe, Cu, Zn の元素マッピングでは, 基底膜近傍の粘膜固有層で高いカウント値を示す領域が存在した。ただ, その領域は元素種によって異なった。したがって, 元素種により粘膜固有層内の局在部位が変化していることから, DEP 付着元素の一部は DEP から解離あるいは溶出して拡散した可能性がある。これらの結果より, DEP が鼻腔に侵入したときの DEP 付着元素の挙動として, (1) DEP に付着したまま嗅神経内に取り込まれ, 軸索輸送により嗅球へと移行する, (2) DEP に付着したまま嗅神経内や嗅上皮内に取り込まれ, 嗅神経の細胞体や基底膜近傍に蓄積する, (3) DEP に付着したまま嗅上皮内に侵入し, 一部は溶出してイオンとなり嗅粘膜内へ拡散する, (4) 鼻腔あるいは粘液層で DEP から溶出した付着元素のイオンが嗅神経内や嗅上皮内に取り込まれ, 嗅粘膜内に拡散する可能性が考えられる。

嗅球の元素マッピングでは, 曝露群の嗅球下部における Ca, Cu, Ni, Zn の元素マッピングにおいて, 高いカウント値を示すスポットが数点現れた。対照群にはそのようなスポットは存在しないことから, DEP が嗅球へ移行したことによるカウント値の増加であると考えられる。この可能性を検証するため, これらのスポットにおける Zn の XAFS 分析を行った。その結果, DEP 懸濁液から得られた XAFS スペクトルと, これらのスポットから得られた XAFS スペクトルの吸収端エネルギーがほぼ一致した。さらに, パターンフィッティングにより DEP 懸濁液に含まれる Zn の化学結合状態と, これらのスポットにおける Zn の化学結合状態が類似していた。このことから, DEP が嗅球まで到達した可能性は十分に考えられる。

一方, 曝露群の嗅球中央部における元素マッピングでは, 対照群との差は見られなかった。また, 糸球体層, 僧帽細胞層, 外叢状層の XAFS 分析を各層 1 点ずつ行ったところ, 対照群の XAFS スペクトルとほぼ一致した。各点の化学結合状態も対照群の化学結合状態と類似したことから, 生体由来の Zn であると考えら

れる。したがって、嗅球への DEP の移行は局在的であったと考えられ、嗅神経の Zone-to-zone projection の構造（図 3-4）より鼻腔に投与した DEP の嗅粘膜への侵入も局在的であったことが考えられる。

本実験の課題として、2 点挙げられる。1 点目は、元素マッピングによる DEP の検出効率の問題である。SR-XRF の感度は他の測定法に比べて非常に感度が良く、超微量元素の検出に優れている。Hayakawa らは、エネルギーが 9 keV のマイクロビームを用いて SR-XRF を行ったとき、Ni の検出限界は 0.3 fg になったと報告した¹⁴。すなわち、SR-XRF は ppt 以下の感度を実現している。したがって、DEP 1 個に付着している各元素の量は極めて少ないものの、検出は可能であると推測する。一方、元素マッピングの際に各点に照射するビームの面積は、1.5（水平方向）× 0.7（垂直方向） μm^2 であった。DEP の粒径を 40 nm とすると、ビームの照射面積は DEP 1 個の断面積の 200 倍以上に相当する。今回は元素マッピング対象元素を Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn としたが、これらは比較的生体内に多く含まれている元素である。すなわち、元素マッピング 1 点あたりに、生体内に元々含まれるこれらの元素から検出されるバックグラウンドは、DEP 1 個に含まれる量に比べて非常に大きくなる。したがって、DEP がバックグラウンドを超える量で存在しない限り、元素マッピングから DEP の存在を確認することはできない。この課題の解決には、生体内にほぼ含まれない元素で、かつ DEP に多く含まれている元素を選定する必要がある。本実験では照射するビームのエネルギーを 10 keV と設定したため、Ge より原子番号の大きい元素の K 殻の励起により得られる蛍光 X 線スペクトルは得られなかった。したがって、ビームのエネルギーを大きくすれば、生体に存在しない重金属の蛍光 X 線スペクトルが検出される可能性がある。溝端らの報告でも、Br や Ba を中心に重金属が検出されており⁴、その可能性は十分に考えられる。このような元素をマッピングしてカウント値の増加が確認できれば、DEP による元素の局在であることがより明確となる。

2 点目として、本実験により曝露群の嗅粘膜および嗅球で Ca, Cu, Ni, Zn が高いカウント値を示したが、これが DEP か DEP から溶出して拡散したイオンかは判断できない。既存の研究においても、ナノ粒子曝露による中枢神経系での曝露由来の元素量の増加から、ナノ粒子の嗅神経を介した侵入を示唆しているが^{13,15}、実際にナノ粒子が嗅神経内を移動することをイメージングにより捉えた報告はない。DEP が嗅神経内に侵入し、嗅球へ到達したことを証明するには、電子顕微鏡により嗅神経 1 本単位で観察する方法しかない。したがって、第 3 章で検討した金コロイド点鼻投与実験のように、実際に嗅球で DEP が存在することを電子顕微鏡を用いて観察する必要がある。これにより、嗅球の糸球体層での元素の局在が DEP の蓄積か、DEP から溶出したイオンの局在であるかが実証される。

4.6 結論

本章では、DEP を吸入曝露もしくは点鼻投与したマウスの嗅粘膜および嗅球における SR-XRF を用いた元素マッピングと、Zn の XAFS 分析を行った。これらの実験より、大気中に存在する DEP が嗅神経を介して嗅球へ移行するかを検討した。

エンジンオイルの組成分析では、添加剤として使用される Zn, Ca, Na, Al, Mo, Ti が主に含まれていた。また、使用後オイル中の元素の重量濃度は使用前オイルより減少した。DEP の組成分析では、エンジンオイルに含まれている Na, Ca, Ti, Zn が検出された。この結果から、ディーゼルエンジンを稼働させると、エンジンオイル中に含まれる金属化合物や金属イオンがディーゼル排気に混入し、Na や Ca, Zn を中心に DEP に付着する可能性が示唆された。

DEP の吸入曝露実験では、曝露群の嗅上皮や嗅神経束において Fe, Cu, Zn, Br のカウント値の増加が見られた。したがって、DEP が嗅神経内に侵入し、一部は細胞体で蓄積し、残りは軸索輸送により嗅神経束へ移行したと考えられる。一方、嗅球の元素マッピングでは、6 元素ともに対照群と曝露群で顕著な違いは見られず、嗅球への移行は確認されなかった。また、嗅粘膜内での元素の局在が DEP 由来であるか判断することはできなかった。

そこで、DEP の嗅神経内の存在をより明確にするため、DEP の懸濁液を作成してマウスの左鼻に投与した。これにより、一度に高濃度の DEP を曝露し、元素マッピングにより DEP が嗅球で存在するかを検討した。さらに、嗅球の元素マッピングで Zn の局在が確認された部位における XAFS 分析を行い、この局在が DEP の嗅球への移行によるものかを検討した。嗅粘膜の元素マッピングでは、曝露群の嗅上皮で元素マッピングした 6 元素全てのカウント値が増加した。したがって、DEP が嗅神経内に侵入し、嗅神経の細胞体で蓄積したと考えられる。また、粘膜固有層の基底膜近傍では、Fe, Cu, Zn の元素マッピングで高いカウント値を示す領域が存在した。このことから、嗅粘膜に侵入した DEP の一部は軸索輸送により嗅球へ移行していることが示唆された。嗅球の元素マッピングでは、曝露群の糸球体層における Ca, Cu, Ni, Zn の元素マッピングにおいて、高いカウント値を示すスポットが数点現れた。対照群にはそのようなスポットは存在しないことから、DEP 付着元素の局在と考えられ、DEP が嗅球へ移行したと考えられる。

Zn の XAFS 分析の結果、DEP 懸濁液から得られた XAFS スペクトルと、曝露群の嗅神経層や糸球体層における Zn の局在部位から得られた XAFS スペクトルの吸収端エネルギーがほぼ一致した。さらに、DEP 懸濁液に含まれる Zn の化学結合状態とこれらのスポットにおける Zn の化学結合状態が類似した。これらの結果から、DEP が嗅神経へ侵入し、軸索輸送により嗅球まで到達した可能性は高い。

一方、曝露群の嗅球の外叢状層、僧帽細胞層、顆粒細胞層における元素マッピングでは、6 元素ともに対照群との差は見られなかった。したがって、二次ニュ

ーロンで DEP の存在は確認されなかった。第3章でも二次ニューロンで金コロイドが観察されなかったことから、嗅神経の軸索終末まで到達したナノ粒子がシナプスを越えて二次ニューロンへ侵入する確率は低いことが推測される。

嗅粘膜の元素マッピングにより、元素の局在部位は元素種により異なった。このことから、DEP付着元素の一部はDEPから溶出して嗅粘膜内で拡散した可能性がある。既存の研究では、曝露された金属イオンが中枢神経系まで到達したことが多数報告されている^{16,17,18}。これらの報告はDEPから解離したイオンも中枢神経系まで移行する可能性を示唆している。アルツハイマー病の原因の一つに、ZnやFeなどの金属イオンが中枢神経系内で蓄積することにより引き起こされることが報告されており^{8,19}、DEPの挙動に加えてDEP付着元素の挙動も解明する必要がある。

参考文献

- 1) Kittelson D. B. (1998) ENGINES AND NANOPARTICLES: A REVIEW. *Journal of Aerosol Science*. **29**: 575-588
- 2) 瀬戸章文, 篠崎修, 斎藤敬三, 篠山鋭一, キム チャンスー, 奥山喜久夫 (2001) ディーゼル排ガス中のナノ粒子の荷電状態及び微細構造. 自動車技術会論文集 **32**: 47-52
- 3) Burtscher H. (2005) Physical characterization of particulate emissions from diesel engines: a review. *Journal of Aerosol Science*. **36**: 896-932
- 4) 吉田隆 (2005) 自動車排出ナノ粒子および DEP の測定と生体影響評価. NTS: 145-155
- 5) Shi J. P., Mark D. and Harrison R. M. (2000) Characterization of Particles from a Current Technology Heavy-Duty Diesel Engine. *Environmental Science and Technology*. **34**: 748-755
- 6) Mukesh S., Avinash K. A., Bharathi K. V. L. (2005) Characterization of exhaust particulates from diesel engine. *Atmospheric Environment*. **39**: 3023-3028
- 7) Lin C., Chen S., Huang K., Hwang W., Chien G. C. and Lin W. (2005) Characteristics of metals in nano/ultrafine/fine/coarse particles collected beside a heavily trafficked road. *Environmental Science and Technology*. **39**: 8113-8122
- 8) Huang X., Cuajungco M. P., Atwood C. S., Moir R. D., Tanzi R. E. and Bush A. I. (2000) Alzheimer's Disease, β -Amyloid Protein and Zinc. *Journal of Nutrition*. **130**: 1488S-1492S
- 9) Matsui Y, Sakai N, Tsuda A, Tarada Y, Takaoka M, Fujimaki H, and Uchiyama I. (2009) Tracking the pathway of diesel exhaust particles from the nose to the brain by X-ray fluorescence analysis. *Spectrochimica Acta Part B*. **64**: 796-801

-
- 10) 川本忠文 (2009) 特集 (硬組織) 非脱灰硬組織凍結切片標本作製技術 (川本法 2008) とその応用, 病理技術研究会誌, **72**: 76-83
 - 11) 桜井弘 (2000) 化学と教育 **48**: 459-463
 - 12) Hughes L. S., Cass G. R., Gone J., Ames M. and Olmez I. (1998) Physical and Chemical Characterization of Atmospheric Ultrafine Particles in the Los Angeles Area. *Environmental Science and Technology* **32**: 1153-1161
 - 13) Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W. and Cox C. (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicology*. **16**: 437-445
 - 14) Hayakawa S., Tohno S., Takagawa K., Hamamoto A., Nishida Y., Suzuki M., Sato Y. and Hirokawa T. (2001) Ultra Trace Characterization Using An X-Ray Microprobe at SPring-8 BL39XU. *ANALYTICAL SCIENCES* **17**: i115-i117
 - 15) Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J., Potter R., Maynard A., Ito Y., Finkelstein J. and Oberdorster G. (2006) Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. *Environmental Health Perspectives*. **114**: 1172-1178
 - 16) Henriksson J., Tallkvist J. and Tjalve H. (1999) Transport of manganese via the olfactory pathway in rats: Dosage dependency of the uptake and subcellular distribution of the metal in the olfactory epithelium and the brain. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **156**: 119-128
 - 17) Takeda A., Ohnuma M., Sawashita J. and Okada S. (1997) Zinc transport in the rat olfactory system *Neuroscience Letters*. **225**: 69-71
 - 18) Henriksson J., Tallkvist J. and Tjalve H. (1997) Uptake of nickel into the brain via olfactory neurons in rats. *Toxicology Letters*. **91**: 153-162
 - 19) Cho H. H., Cahill C. M., Vanderburg C. R., Scherzer C. R., Wang B. Huang X. and Rogers J. T. (2010) Selective Translational Control of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein Transcript by Iron Regulatory Protein-1. *Journal of Biological Chemistry*. **285**: 31217-31732

第5章 ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行

5.1 背景

蛍光ポリスチレンナノ粒子および金コロイドを曝露した嗅神経のイメージングにより、ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行経路が存在することを確認した。また、DEPを曝露した嗅神経のイメージングにより、我々が実際に曝露されうるナノ粒子も嗅神経を介して中枢神経系へ移行する可能性が示唆された。しかし、これらの実験からでは、嗅神経を介してどの程度中枢神経系へ移行するかを定量的に評価することはできない。この経路の移行量を解明することにより、ナノ粒子の中枢神経系へのリスク評価に大きく貢献することができる。

放射性シリカ粒子の尾静脈投与実験では、最大で投与量の 0.032%が嗅球で、0.16%が脳で確認された。ナノ粒子の主要な移行経路と考えられる血流経路と比較して、嗅神経経路の移行量が血中経路の移行量よりも大きければ、中枢神経系への特異的な移行経路として大きな意味を持つ。血中経路と嗅神経経路の移行量を定量的に比較検討した報告はなく、この問題を解明する意義は大きい。

本章では、放射性シリカナノ粒子 (^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子) をマウスに点鼻投与し、嗅神経を介した中枢神経系への移行量を定量した。得られた嗅球および脳への移行量を、第2章で得られた血中経路の移行量と比較した。次に、神経細胞のモデルとして使用されるラット副腎髄質由来褐色細胞腫 (PC12 細胞) に ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子を曝露し、PC12 細胞内への侵入量を経時的に検討した。また、粒径の異なる蛍光ポリマー粒子および粒子表面の修飾が異なる量子ドットを PC12 細胞に曝露し、粒径や表面修飾により PC12 細胞内への侵入量がどの程度変化するかを検討した。これらの実験より、ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行を定量的に捉えるとともに、粒径および表面修飾がナノ粒子の神経細胞内への侵入量に影響を与えるかを解明することを目的とした。

5.2 放射性シリカナノ粒子を点鼻投与したマウスにおけるナノ粒子の体内動態

5.2.1 はじめに

第2章の ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子 (11 nm)、 ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) の尾静脈投与実験では、血中に投与した ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子が嗅球や脳へはほとんど移行しなかった (<0.2%)。この結果から、血中を介したナノ粒子の中枢神経系への移行量は少ないことが確認された。一方、既存の研究では、ナノ粒子の吸入曝露により中枢神経系でのナノ粒子量が増加しており^{1,2,3}、ナノ粒子の中枢神経系への移行は血中経路よりも嗅神経経

路の方が寄与が大きい可能性がある。この可能性を検証するためには、血中経路の移行量と嗅神経経路の移行量を比較することにより検討する必要がある。そこで本実験では、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子をマウスに点鼻投与し、投与後の嗅球および脳に含まれる放射能を定量した。これにより、嗅神経を介したナノ粒子の中枢神経系への移行を定量的に検討した。また、本実験での定量結果と第2章の定量結果を比較し、血中経路と嗅神経経路のどちらの経路がナノ粒子の中枢神経系への移行により寄与しているかを検討した。

5.2.2 実験方法

5.2.2.1 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の調整

2.3.2.1 と同様の方法で、 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子を限外ろ過を用いて調整した。アデノシン 5'-二リン酸三ナトリウム (^{14}C -ADP, 740 kBq/mL, Perkin Elmer 社製) 30 μL と、シランカップリング試薬 (Fluka 社製) 1 μL に蒸留水 0.5 mL, エタノール 0.5 mL を添加し、室温で混合した。この溶液に、TEOS (Wako 社製) 2 μL , エタノール 30 μL , 水酸化アンモニウム 10 μL を添加し、7~8 日間、室温で重合反応させた。重合反応完了後、攪拌式限外ろ過装置 (Model 8003 series, ミリポア社製) を用いて限外ろ過を行った。はじめに、孔径 30 nm 以下のメンブレンフィルター (YM-100, ミリポア社製) を用いて、粒径が 30 nm より大きくなった ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子を取り除いた。次に、得られたろ液を、孔径 6 nm 以下のメンブレンフィルター (YM-10, ミリポア社製) を用いて限外ろ過を行い、装置本体に残った懸濁液 1 mL を回収した。回収した懸濁液に、塩化ナトリウムを終濃度が 0.9% となるように添加し、血液中の塩分濃度と同等にした。

この懸濁液を、粒径測定システム (ELSZ-0, 大塚電子社製) を用いて粒度分布を測定した。投与試料作成直後に粒度分布を測定したところ、ピーク粒径が 100 nm 以下となったため、第2章で行った遠心分離は行わず、この懸濁液を投与試料液とした。また、この懸濁液中の放射能を液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloca 社製) にて定量した。得られた放射能とピーク粒径から、2.3.2.1 の (1) 式を用いて ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の重量濃度を算出した。

5.2.2.2 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の点鼻投与と放射能の測定

本実験では、ICR マウス (雄, 8 週齢) を 24 匹用いた。実験群は、対照群 (3 匹), 投与群 (21 匹) の 2 群とした。投与群のマウスには、投与する直前にアバーチン麻酔液を 0.025 mL/g body weight となるように腹腔内注射した。麻酔完了後、8.8 μg SiO₂/kg body weight となるように、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子懸濁液を両鼻に点鼻投与した。投与から 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 時間後に、各時間 3 匹ずつアバーチン麻酔液を腹腔内注射し、麻酔完了後に開頭して脳と嗅球を摘出した。また、対照群のマウスには何も投与せず、アバーチンで麻酔をかけた後に脳と嗅球を摘出した。電子天秤にて脳と嗅球の全重量を秤量後、細かく刻んで

ホモジナイズし、脳は 150 mg、嗅球は全量をシンチレーションバイアルに入れた。ソルエン 350 を 1 mL 添加した後、50°C で一晚静置して組織を溶解した。加温後、ハイオニックフローを脳には 15 mL、嗅球には 10 mL 添加し、この溶液に含まれる放射能を液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloca 社製) にて定量した。 ^{14}C の測定効率率は 89.6% であった。分析条件として、各サンプルの測定時間 5 分、繰り返し測定回数 1 回とした。得られた放射能から、2.3.2.3 の (2) ~ (5) 式を用いて、脳および嗅球に含まれる ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の重量濃度と投与量に対する百分率を算出した。

5.2.3 結果

図 5-1 は限外ろ過により調整した ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子懸濁液の粒度分布である。懸濁液中の ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子のピーク粒径は 37.4 nm、粒径範囲は 32.6~186 nm であった。

表 5-1 は ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子点鼻投与後の嗅球および脳中のシリカ重量濃度である。嗅球では、投与 0.5 時間後で重量濃度が最大 (1.27×10^3 pg SiO₂/mg tissue) となった。その後、投与 2 時間後 (54.7 pg SiO₂/mg tissue) まで一度減衰した後、投与 4 時間後で 790 pg SiO₂/mg tissue まで増加した。その後、投与 8 時間後では 11.5 pg SiO₂/mg tissue、投与 24 時間後では 35.6 pg SiO₂/mg tissue となり、大きく減少した。一方、脳中のシリカ重量濃度では、投与 0.5 時間後で最小 (0.77 pg SiO₂/mg tissue) となり、投与 1 時間後で最大 (15.0 pg SiO₂/mg tissue) となった。その後、投与 6 時間後まで減衰したものの (0.81 pg SiO₂/mg tissue)、投与 8 時間後 (5.11 pg SiO₂/mg tissue) および投与 24 時間後 (7.40 pg SiO₂/mg tissue) では増加した。

図 5-2 は、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子点鼻投与後の嗅球および脳における投与量に対する百分率(以下、移行率と記す)を、第 2 章の ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子 (11 nm) および ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子 (130 nm) 体内動態実験で得られた嗅球および脳における移行率と比較した図である。点鼻投与後の嗅球では、投与 0.5 時間後に最大となり、投与量の 3.6% が嗅

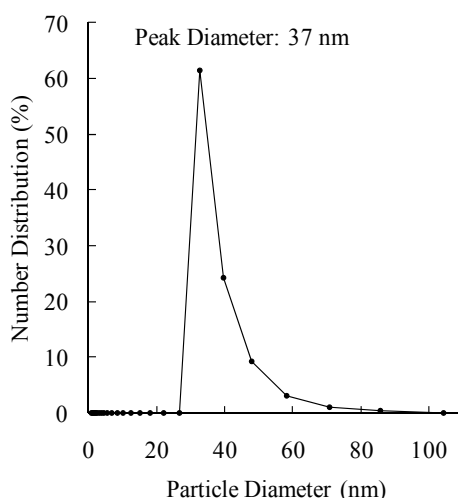


図 5-1 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の粒度分布

表 5-1 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子（粒径 37 nm）点鼻投与後の嗅球および脳中のシリカ重量濃度

Sample	重量濃度 (pg SiO ₂ /mg tissue)													
	0.5 時間後		1 時間後		2 時間後		4 時間後		6 時間後		8 時間後		24 時間後	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
嗅球	1270	634	408	26.0	54.7*	16.0	790*	509	355	74.4	11.5*	10.6	35.6	42.9
脳	0.77**	—	15.0**	—	10.8	1.80	3.56	1.47	0.81**	—	5.11*	2.61	7.40	2.60

* n = 2 匹/投与群, ** n = 1 匹/投与群

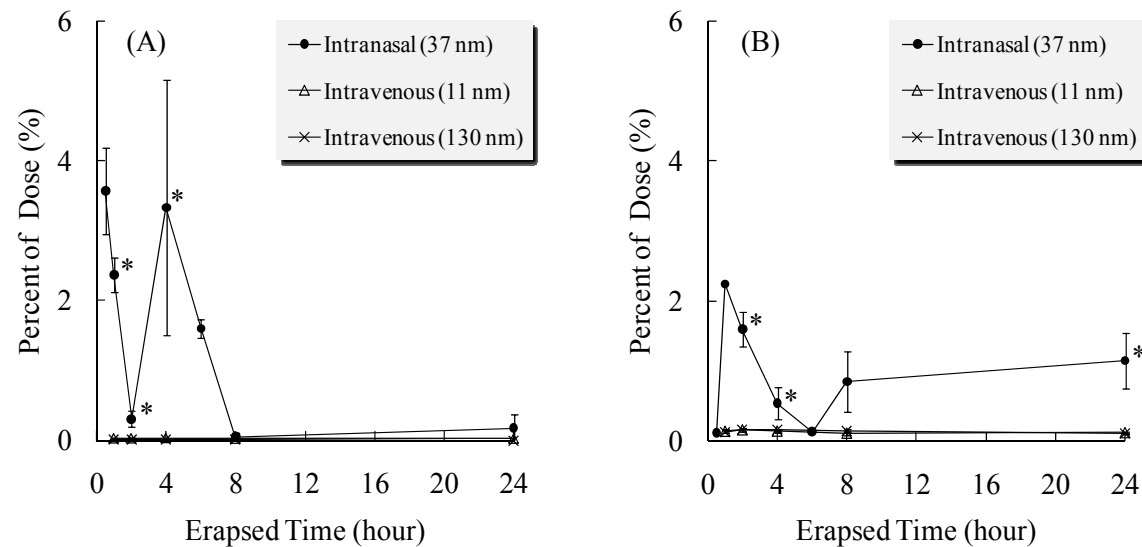


図 5-2 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子（37 nm）点鼻投与後と、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子（11 nm）および ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）尾静脈投与後の嗅球、脳中における移行した ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子の投与量に対する百分率 (A) : 嗅球, (B) : 脳
* ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子（11 nm）投与群および ^{14}C -ADP-SiO₂ サブミクロン粒子（130 nm）投与群に対する t 検定結果 ($p < 0.05$)

球に含まれ、尾静脈投与後の嗅球よりも有意に大きくなった。投与 8 時間後では投与量の 0.050%まで減少したものの、投与 24 時間後には再び増加して投与量の 0.17%となり、尾静脈投与後の嗅球と比べて有意に増加した。尾静脈投与後の嗅球では、投与 4 時間後に示した投与量の 0.032%が最大であり、点鼻投与から 8 時間後に示した嗅球での最小値 0.050%よりも小さくなった。

点鼻投与後の脳では、投与 0.5 時間後が投与量の 0.11%で最小となり、尾静脈投与後の脳と有意な差は認められなかった。しかし、投与 1 時間後では投与量の 2.2%まで増加して最大となり、尾静脈投与後の脳に比べて有意に増加した。投与 6 時間後では投与量の 0.13%まで減少したものの、その後は投与 24 時間後まで増加し続けた。投与 24 時間後では投与量の 1.1%が脳に含まれ、尾静脈投与後の脳と比べて有意に増加した。一方、尾静脈投与後の脳では、投与 2 時間後に示した 0.16%が最大で、投与後の経過時間による変化はほぼ見られなかった。

5.2.4 考察

点鼻投与後の嗅球では、投与 0.5 時間後にシリカ重量濃度が最大となった。既存の研究では、鼻腔に侵入したナノ粒子は曝露から 1 時間後には嗅球で確認されている。De Lorenzo は、粒子表面が銀でコーティングされた金ナノ粒子（粒径 50 nm）をリスザルへ点鼻投与した⁴。透過型電子顕微鏡による観察の結果、投与から 1 時間後に嗅球の糸球体層で金ナノ粒子が確認された。したがって、 $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ ナノ粒子も投与直後から嗅神経内に侵入し、0.5 時間後には嗅球へ到達したと考えられる。

点鼻投与後の嗅球、脳中のシリカ重量濃度は経過時間とともに大きく変化した。ナノ粒子が嗅神経を介して中枢神経系へ移行する場合、ナノ粒子は求心性の軸索輸送（順行性軸索輸送）により中枢神経系へ移行すると考えられる。この輸送速度は既存の研究で明らかになっている^{5,6,7}。順行性の輸送速度は、速い順行性輸送（50～400 mm/day）と、遅い順行性輸送（0.2～8 mm/day）に分けられる。嗅球では投与 0.5 時間後と投与 4 時間後で値が高くなっていることから、投与 0.5 時間後に検出されたピークは速い軸索輸送により、投与 4 時間後に検出されたピークは遅い軸索輸送により、 $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ ナノ粒子が嗅球へ到達したと考えられる。実際、嗅球では投与 0.5 時間後に $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ ナノ粒子量が最大となったが、脳では最小値を示した。その後、脳中の $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ ナノ粒子量が急激に増加し、投与 1 時間後で最大値を示した。このことから、 $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ ナノ粒子が軸索輸送により鼻腔から嗅球へ、嗅球から脳へと移行した可能性が高い。

点鼻投与後の嗅球および脳中での移行率は、嗅球では最大で 3.6%、脳では最大で 2.2%となった。一方、第2章で得られた $^{14}\text{C-ADP-SiO}_2$ 粒子の尾静脈投与後の嗅球および脳中での移行率は、嗅球で最大 0.032%、脳で最大 0.16%となり、点鼻投与による移行率の方が有意に大きくなった。この結果から、中枢神経系への移行経路は血流を介した移行経路よりも、嗅神経を介した移行経路の方が寄与が大きいことが確認された。

5.3 PC12細胞を用いたナノ粒子の神経細胞内への侵入

5.3.1 はじめに

ナノ粒子を曝露した嗅神経のイメージング実験と定量実験により、ナノ粒子が嗅神経に侵入して中枢神経系へ移行することが示された。そこで本節では、ナノ粒子の嗅神経への侵入メカニズムに関して検討した。これにより、どのような物理化学的特性を持つナノ粒子が嗅神経を介して中枢神経系へ移行しやすいかが明らかとなる。

既存の研究により、ナノ粒子が細胞内に侵入することが多数報告されている^{8,9}。また、ナノ粒子の細胞内への侵入には様々な物理化学的パラメーターが関与していると考えられている。その研究の多くは、粒径^{10,11}や表面修飾¹²がナノ粒子の細胞内への侵入に関与すると報告している。したがって、これらのパラメーターがナノ粒子の嗅神経への侵入に関与している可能性がある。ただ、嗅神経に関してナノ粒子の侵入メカニズムを検討した報告はない。これは、嗅神経の培養が非常に難しいことにある。また、一般的な神経細胞へのナノ粒子の侵入メカニズムも明らかにはされていない。

本節では、はじめに ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子を PC12 細胞に曝露した。これにより、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の神経細胞内への侵入量を経時的に検討した。次に、粒径の異なる3種類の蛍光ポリマー粒子と、粒子表面の修飾が異なる3種類の量子ドットを PC12 細胞に曝露した。曝露後、細胞内への侵入量および細胞膜への沈着量を定量し、粒径および表面修飾の違いによる神経細胞内への侵入の変化を検討した。これらの実験より、ナノ粒子の神経細胞内への侵入量の経時変化と、粒径や表面修飾の違いによる神経細胞内への侵入量に対する影響を解明することを目的とした。

5.3.2 実験方法

5.3.2.1 細胞培養

ナノ粒子を曝露する細胞は接着系 PC12 細胞 (CRL-1721.1TM, ATCC 社製) を用いた。PC12 細胞を Poly-D-Lysine Cellware dish (φ 100 mm, Biocoat 社製) に播種し、RPMI 1640 (GIBCO 社製) に Horse Serum (GIBCO 社製) と Fetal Bovine Serum (CeLLect 社製) を終濃度がそれぞれ 10% (v/v) と 5% (v/v) となるように加えた培養液をディッシュに添加して培養した。このディッシュをインキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) に入れて培養し、2~3 日で培地交換, 80%程度コンフルエントとなった時点で継代を行った。継代は各ディッシュに 1×10^6 cells/Dish~ 4×10^6 cells/Dish となるように細胞を播種し、インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で培養した。

5.3.2.2 投与試料の調整

曝露する粒子は ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子と、粒径の異なる3種類の蛍光ポリマー粒子および表面修飾の異なる3種類の量子ドットを用いた。 ^{14}C -ADP-SiO₂ 粒子は 2.3.2.1 と同様の方

法で調整した。孔径 30 nm 以下のメンブレンフィルター (YM-100, ミリポア社製) で限外ろ過した後, 装置本体に残った懸濁液 1 mL を回収した。この懸濁液の粒度分布を測定したところ, ピーク粒径が 100 nm 以下となったため, この懸濁液を培養液に懸濁する試料とした。懸濁液中の放射能を, 液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloca 社製) にて定量した。 ^{14}C の測定効率は 89.6% であった。分析条件として, 各サンプルの測定時間 3 分, 繰り返し測定回数 1 回とした。得られた放射能と 5.3.2.3 で得られたピーク粒径を用いて, 2.3.2.1 の (1) 式より懸濁液中の重量濃度を算出した。作成した ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子懸濁液を, RPMI 1640 液に終濃度が 2.5% (v/v) となるように懸濁した液を投与試料とした。

蛍光ポリマー粒子は 22 nm 粒子 (R25, 個数濃度 1.7×10^{15} particles/mL, モリテックス社製), 100 nm 粒子 (R100, 個数濃度 1.8×10^{13} particles/mL, モリテックス社製), 1000 nm 粒子 (R0100, 個数濃度 1.8×10^{10} particles/mL, モリテックス社製) の懸濁液を使用した。3 種類の蛍光ポリマー粒子ともに, 密度 1.06 g/cm^3 , 励起波長 542 nm, 蛍光波長 612 nm の粒子である。RPMI 1640 液に終濃度が 0.5% (v/v) となるように各蛍光ポリマー粒子を懸濁した液を投与試料とした。

量子ドットはカルボキシル基修飾粒子 (Qdot® ITK™ Carboxyl Quantum Dots, モル濃度 8 μM , Invitrogen 社製), アミノ基修飾粒子 (Qdot® ITK™ Amino (PEG) Quantum Dots, モル濃度 8 μM , Invitrogen 社製), 表面修飾なしの粒子 (Qtracker® non-targeted Quantum Dots, モル濃度 2 μM , Invitrogen 社製) の懸濁液を使用した。3 種類の量子ドットともに, 粒径 10 ~ 20 nm, 励起波長 350 nm, 蛍光波長 565 nm の粒子である。各量子ドットの個数濃度は, モル濃度および粒子 1 個あたりに含まれる半導体物質 (セレンとカドミウムの混合物) の原子数 (数百個~数千個), アボガドロ数により算出した。粒子 1 個あたりに含まれる半導体物質の原子数を 1000 個として算出し, 各量子ドットの個数濃度をカルボキシル基修飾粒子が 4.8×10^{15} particles/mL, アミノ基修飾粒子が 4.8×10^{15} particles/mL, 表面修飾なしの粒子が 1.2×10^{15} particles/mL とした。RPMI 1640 液に終濃度が 0.5% (v/v) となるように各量子ドットを懸濁した液を投与試料とした。

5.3.2.3 培養液中でのナノ粒子の粒度分布

^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子, 蛍光ポリマー粒子, 量子ドットの培養液中の粒度分布 (個数分布) を, 粒径測定システム (ELSZ-0, 大塚電子社製) にて測定した。測定する粒径の範囲を 1 ~ 5000 nm と設定して粒度分布を測定し, 懸濁液中に存在する粒子のピーク粒径と粒径範囲を求めた。 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子は, RPMI 1640 液に終濃度が 50% (v/v) となるように懸濁し, 懸濁直後, 懸濁 1 時間後, 懸濁 4 時間後, 懸濁 24 時間後の粒度分布を測定した。蛍光ポリマー粒子と量子ドットは, RPMI 1640 液に終濃度が 0.5% (v/v) となるように懸濁し, 懸濁直後と 3 時間後の粒度分布を測定した。また, 懸濁してから測定までの間は, インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で静置した。

5.3.2.4 ナノ粒子の細胞内侵入量の定量

80%程度コンフルエントとなった PC12 細胞を回収し、各ディッシュに $0.8 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^6$ cells/well となるように播種した。3～5 日間インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で培養した後、各投与試料を曝露した。培養液をアスピレーターで吸引除去した後、投与試料を 2 mL 添加した。投与試料添加後、¹⁴C-ADP-SiO₂ ナノ粒子曝露群はインキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で 1 時間、4 時間、8 時間、24 時間曝露 (各時間曝露群で n = 3) した。同様に、蛍光ポリマー粒子曝露群 (各粒子曝露群で n = 3) および量子ドット曝露群 (各粒子曝露群で n = 3) は、インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で 3 時間曝露した。また対照群 (n = 3) として、RPMI 1640 液のみを 2 mL 添加し、インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で 3 時間培養した。

曝露時間経過後、滅菌済 PBS で 3 回洗浄し、洗浄後に存在する細胞数を計数した。その後、アスピレーターで滅菌済 PBS を吸引除去し、1% トリトン X-100 含有 PBS を 1 mL 添加してホモジナイズし、細胞膜を破壊した。これを遠心分離 (1000 rpm, 10 分間) して細胞を沈降させ、その上澄み液を回収した。また、沈殿物は PBS で 3 回洗浄し、アスピレーターで PBS を吸引除去した後、PBS を 1 mL 添加して懸濁させた沈殿物を回収した。回収した上澄み液中に存在する粒子を細胞内に侵入した粒子、沈殿物中に存在する粒子を細胞膜に沈着した粒子とした。

¹⁴C-ADP-SiO₂ ナノ粒子曝露群は、回収した上澄み液と沈殿物を液体シンチレーションカウンタにて定量した。¹⁴C の測定効率は 89.6% であった。分析条件として、各サンプルの測定時間 5 分、繰り返し測定回数 2 回とした。得られた放射能と 5.3.2.3 で得られたピーク粒径から、2.3.2.1 と同様の方法にて上澄み液と沈殿物中に存在するシリカの粒子数を算出した。これを計数した細胞数で除することで、細胞 1 個あたりに存在する粒子数を算出した。また、細胞 10⁶ 個あたりに細胞内に侵入した粒子数および細胞膜に沈着した粒子数を算出し、これを曝露した粒子数で除することで、細胞 10⁶ 個あたりに存在する粒子の曝露量に対する百分率を算出した。

蛍光ポリマー粒子曝露群と量子ドット曝露群では、回収した上澄み液と沈殿物を蛍光光度計 (RF-5300PC, 島津製作所社製) を用いて試料から発する蛍光の強度を測定した。励起波長は、蛍光ポリマー粒子曝露群では 520 nm, 量子ドット曝露群では 350 nm と設定し、蛍光波長 350～650 nm の蛍光強度を測定した。対照群は励起波長 350 nm および 520 nm で設定し、それぞれ蛍光波長 350～650 nm の蛍光強度を測定した。得られた蛍光スペクトルのピークから、蛍光ポリマー粒子曝露群は蛍光波長 570 nm の蛍光強度を、量子ドット曝露群は蛍光波長 565 nm の蛍光強度を分析対象とした。検量線用試料として、蛍光ポリマー粒子と量子ドットを PBS で $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 倍希釈し、これらの蛍光強度を測定して検量線を作成した。この検量線から、上澄み液と沈殿物中に存在する粒子数を算出した。また蛍光ポリマー粒子曝露群は、算出した粒子数、粒径、密度 (1.06 g/cm³) から上澄み液と沈殿物中に存在する粒子重量を算出した。

5.3.2.5 ナノ粒子の細胞毒性試験

80%程度コンフルエントとなった PC12 細胞を回収し、マイクロプレート (Poly-D-Lysine Cellware 96 well Plate, Biocoat 社製) の各ウェルに 1×10^4 cells/well となるように播種した。インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で3日間培養した細胞に、終濃度が 0.01%, 0.1%, 1% (v/v) となるように RPMI 1640 液に懸濁させた量子ドットと、終濃度が 0.1%, 1%, 10% (v/v) となるように RPMI 1640 液に懸濁させた蛍光ポリマー粒子を各ウェルに 200 μ L 滴下し、インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で24時間曝露した。また、RPMI 1640 液を 200 μ L 滴下したウェルを対照群とした。その後、Cell Counting Kit-8 (同仁化学社製) を各ウェルに 10 μ L 添加し、さらに2~3時間インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で培養した。各ウェルの吸光度を、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD 社製) を用いて測定した。対照群の生存率を 100% として、対照群の吸光度との比から曝露群の生存率を百分率で表した。

5.3.3 結果

5.3.3.1 ナノ粒子の培養液中の粒度分布

図 5-3 は ¹⁴C-ADP-SiO₂ ナノ粒子を RPMI 1640 液中に懸濁させた際の粒度分布である。懸濁後のピーク粒径は、懸濁直後では 57.7 nm, 懸濁 1 時間後では 32.4 nm, 懸濁 4 時間後では 32.1 nm, 懸濁 24 時間後では 39.5 nm となり、いずれも単分散となった。

図 5-4 は蛍光ポリマー粒子を RPMI 1640 液中に懸濁させた際の粒度分布である。懸濁直後のピーク粒径は、22 nm 粒子懸濁液では 25.6 nm, 100 nm 粒子懸濁液では 158 nm, 1000 nm 粒子懸濁液で 1090 nm であった。100 nm 粒子懸濁液と 1000 nm 粒子懸濁液は単分散となったものの、22 nm 粒子懸濁液では 70.7 nm をピーク粒径とする二次ピークがわずかに現れた。

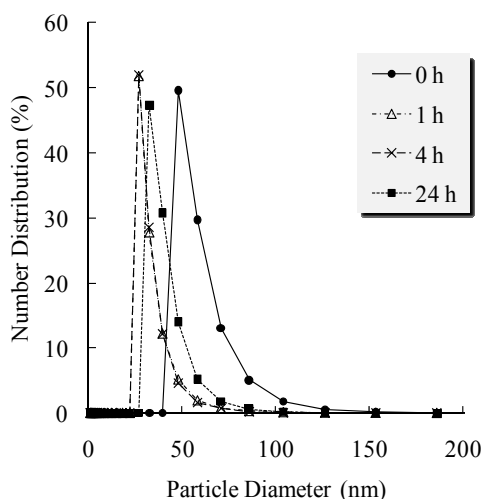


図 5-3 ¹⁴C-ADP-SiO₂ ナノ粒子の培養液中の粒度分布
懸濁直後 (丸), 懸濁 1 時間後 (三角),
懸濁 4 時間後 (バツ), 懸濁 24 時間後 (四角)

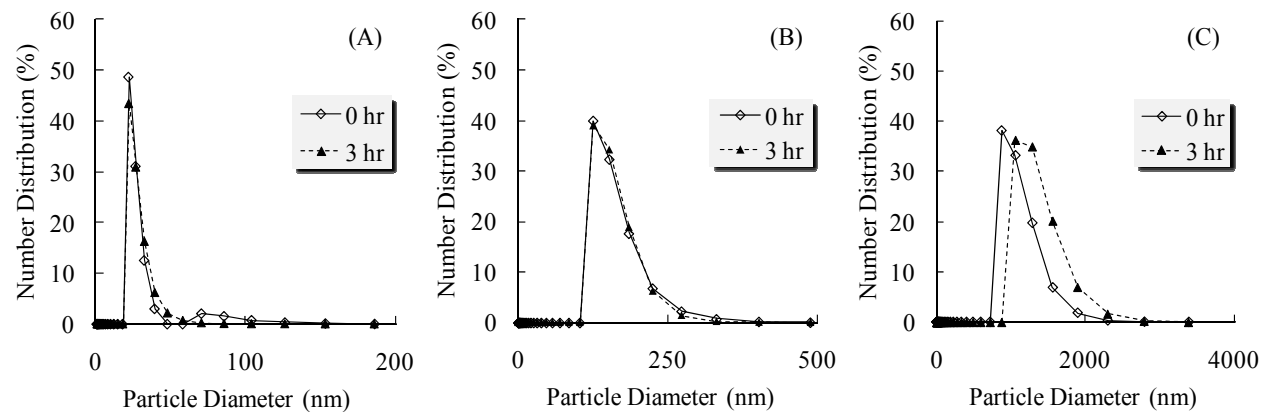


図 5-4 蛍光ポリマー粒子の培養液へ懸濁した直後（菱形）と懸濁 3 時間後（三角）の粒度分布
(A) : 22 nm 粒子, (B) : 100 nm 粒子, (C) : 1000 nm 粒子

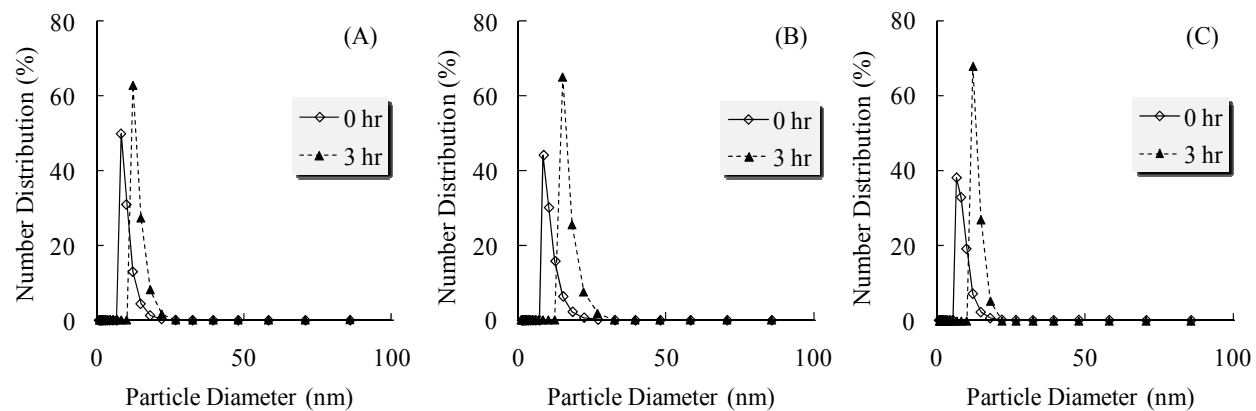


図 5-5 量子ドットの培養液へ懸濁した直後（菱形）の粒度分布と懸濁 3 時間後（三角）の粒度分布
(A) : カルボキシル基修飾粒子, (B) : アミノ基修飾粒子, (C) : 表面修飾なしの粒子

懸濁してから3時間後の粒径は、22 nm 粒子懸濁液では 27.3 nm, 100 nm 粒子懸濁液では 156 nm, 1000 nm 粒子懸濁液では 1330 nm となった。3 時間後の懸濁液は全て単分散となった。

図 5-5 は量子ドットを RPMI 1640 液中に懸濁させた際の粒度分布である。懸濁直後のピーク粒径は、カルボキシル基修飾粒子懸濁液では 10.0 nm, アミノ基修飾粒子懸濁液では 10.4 nm, 表面修飾なしの粒子懸濁液で 8.7 nm であった。また、懸濁してから3時間後のピーク粒径は、カルボキシル基修飾粒子懸濁液では 13.7 nm, アミノ基修飾粒子懸濁液では 16.6 nm, 表面修飾なしの粒子懸濁液では 13.4 nm となった。

5.3.3.2 ナノ粒子の PC12 細胞内侵入量

図 5-6 は ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子を 1 時間, 4 時間, 8 時間, 24 時間曝露した PC12 細胞における, 細胞内に侵入した粒子数と細胞膜に沈着した粒子数である。細胞 1 個あたりに細胞内に侵入した粒子数は, 曝露時間の経過とともに増加した。特に, 曝露 4 時間後では細胞 1 個あたり 2.4 個だった侵入数が, 曝露 8 時間後では 9.0 個となり急激に増加した。曝露 8 時間後でピークとなり, 曝露 24 時間後では 8.4 個で, 曝露 8 時間後からほとんど変化は見られなかった。また, 細胞膜に沈着した粒子数も, 曝露 4 時間後から急激に増加した。曝露 1 時間後は 0.70 個, 曝露 4 時間後は 0.85 個で対照群と有意な差は見られなかったものの, 曝露 8 時間後では 4.7 個, 曝露 24 時間後では 8.2 個となり, 曝露 4 時間後から 24 時間後にかけて有意に増加した。

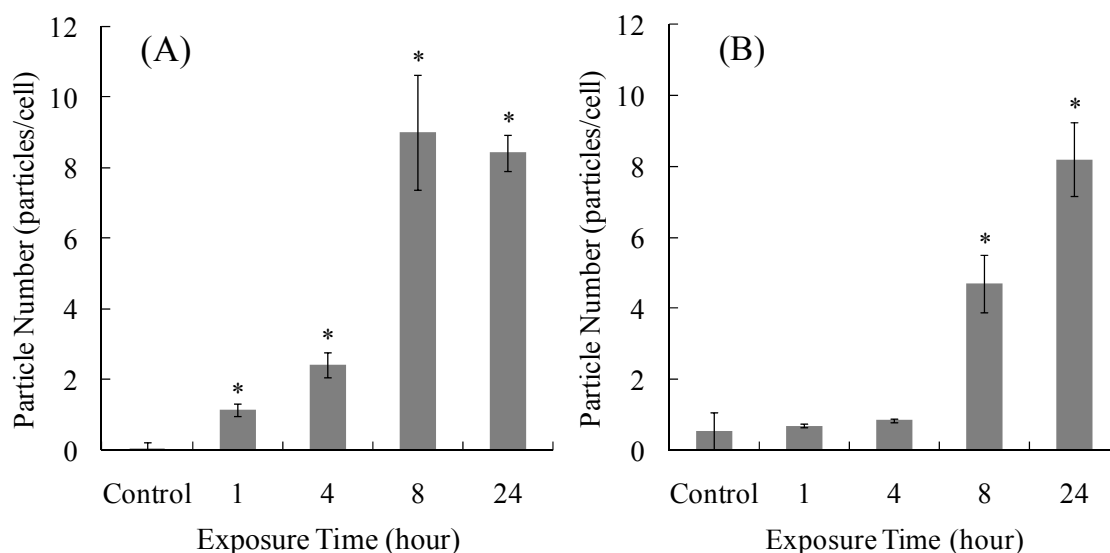


図 5-6 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子 (粒径 58 nm) を 1~24 時間曝露した PC12 細胞における細胞内に侵入した粒子数および細胞膜に沈着した粒子数

(A) : PC12 細胞 1 個あたりに侵入した粒子数

(B) : PC12 細胞 1 個あたりに細胞膜に沈着した粒子数

* 対照群に対する t 検定結果 ($p < 0.05$)

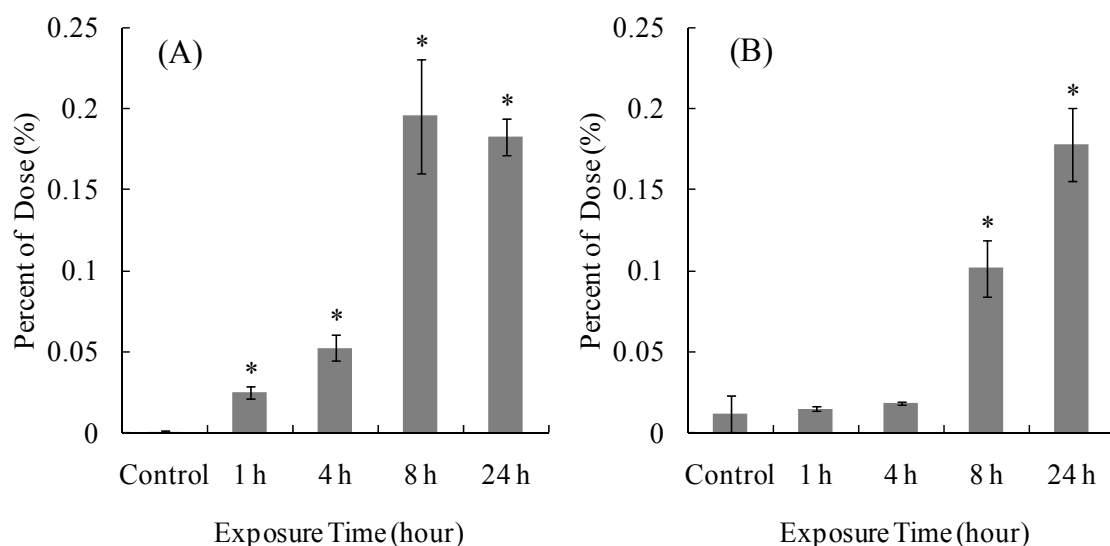


図 5-7 ^{14}C -ADP- SiO_2 ナノ粒子 (粒径 58 nm) を 1~24 時間曝露した PC12 細胞における細胞内に侵入した粒子および細胞膜に沈着した粒子の曝露量に対する百分率
(A) : PC12 細胞 10^6 個あたりに侵入した粒子の曝露量に対する百分率
(B) : PC12 細胞 10^6 個あたりに細胞膜に沈着した粒子の曝露量に対する百分率
* 対照群に対する t 検定結果 ($p < 0.05$)

図 5-7 は、細胞 10^6 個あたりに細胞内に侵入した ^{14}C -ADP- SiO_2 ナノ粒子と、細胞膜に沈着した ^{14}C -ADP- SiO_2 ナノ粒子の曝露量に対する百分率である。細胞内に侵入した粒子の曝露量に対する百分率は、曝露 8 時間後で最大となり 0.20%を示した。また、細胞膜に沈着した粒子の曝露量に対する百分率は、曝露 24 時間後で最大となり 0.18%を示した。

図 5-8 は蛍光ポリマー粒子を 3 時間曝露した PC12 細胞における、細胞内に侵入した粒子数と細胞膜に沈着した粒子数である。細胞 1 個あたりに細胞内に侵入した粒子数は、22 nm 粒子曝露群が圧倒的に多く、 2.1×10^4 個であった。100 nm 粒子曝露群では、 3.9×10^2 個の粒子が細胞内に侵入した。また、1000 nm 粒子曝露群は 2.4×10^2 個となり、ほとんど粒子は侵入しなかった。細胞膜に沈着した粒子数も 22 nm 粒子曝露群が圧倒的に多く、 1.6×10^4 個であった。100 nm 粒子曝露群では 1.4×10^2 個、1000 nm 粒子曝露群では 2.3×10^2 個となり、1000 nm 粒子は細胞内に侵入した粒子数と細胞膜へ沈着した粒子数がほぼ等しくなった。

一方、曝露量に対する百分率で評価すると、異なる傾向が現れた。図 5-9 は、図 5-8 の縦軸を蛍光ポリマー粒子の曝露量に対する百分率で表した図である。細胞 10^6 個あたりに細胞内に侵入した粒子の曝露量に対する百分率は、22 nm 粒子曝露群が 0.12%、100 nm 粒子曝露群が 0.22%となり、100 nm 粒子曝露群の方が大きくなった。また、1000 nm 粒子曝露群では 0.013%となり、22 nm 粒子曝露群および 100 nm 粒子曝露群と比べて有意に小さくなった。細胞膜に沈着した粒子の曝露量に対する百分率は、22 nm 粒子曝露群が 0.097%、100 nm

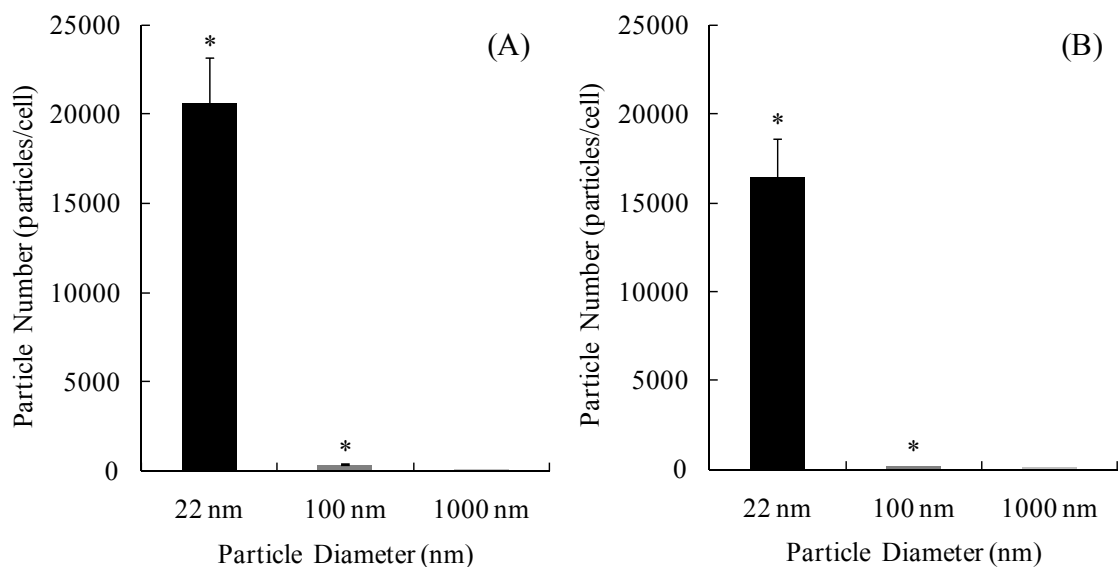


図 5-8 蛍光ポリマー粒子（粒径 22 nm, 100 nm, 1000 nm）を 3 時間曝露した PC12 細胞における粒子数および細胞膜に沈着した粒子数

(A) : PC12 細胞 1 個あたりに侵入した粒子数

(B) : PC12 細胞 1 個あたりに細胞膜に沈着した粒子数

* 1000 nm 粒子曝露群に対する t 検定結果 ($p < 0.05$)

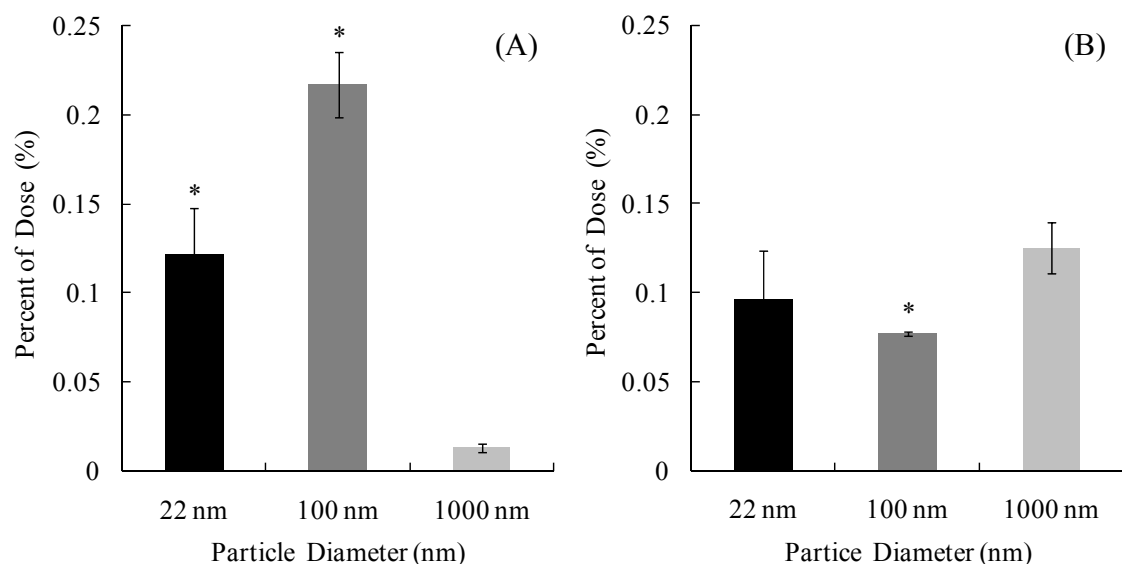


図 5-9 蛍光ポリマー粒子（粒径 22 nm, 100 nm, 1000 nm）を 3 時間曝露した PC12 細胞における細胞内に侵入した粒子および細胞膜に沈着した粒子の曝露量に対する百分率

(A) : PC12 細胞 10^6 個あたりに侵入した粒子の曝露量に対する百分率

(B) : PC12 細胞 10^6 個あたりに細胞膜に沈着した粒子の曝露量に対する百分率

* 1000 nm 粒子曝露群に対する t 検定結果 ($p < 0.05$)

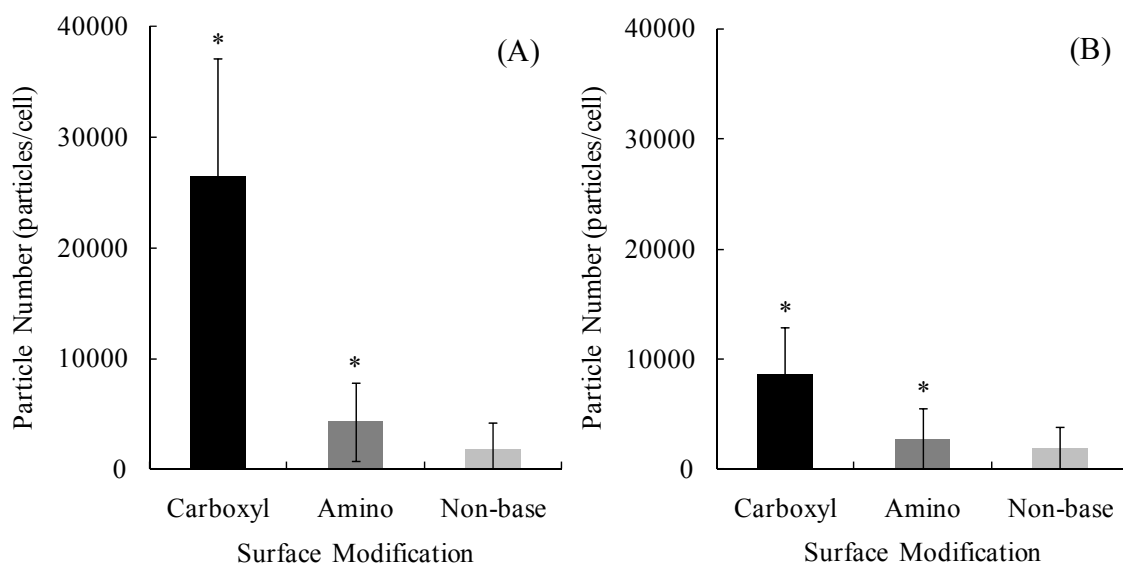


図 5-10 量子ドット (カルボキシル基修飾粒子, アミノ基修飾粒子, 表面修飾なしの粒子) を 3 時間曝露した PC12 細胞における粒子数および細胞膜に沈着した粒子数
(A) : PC12 細胞 1 個あたりに侵入した粒子数
(B) : PC12 細胞 1 個あたりに細胞膜に沈着した粒子数

* 表面修飾なしの量子ドット曝露群に対する t 検定結果 ($p < 0.05$)

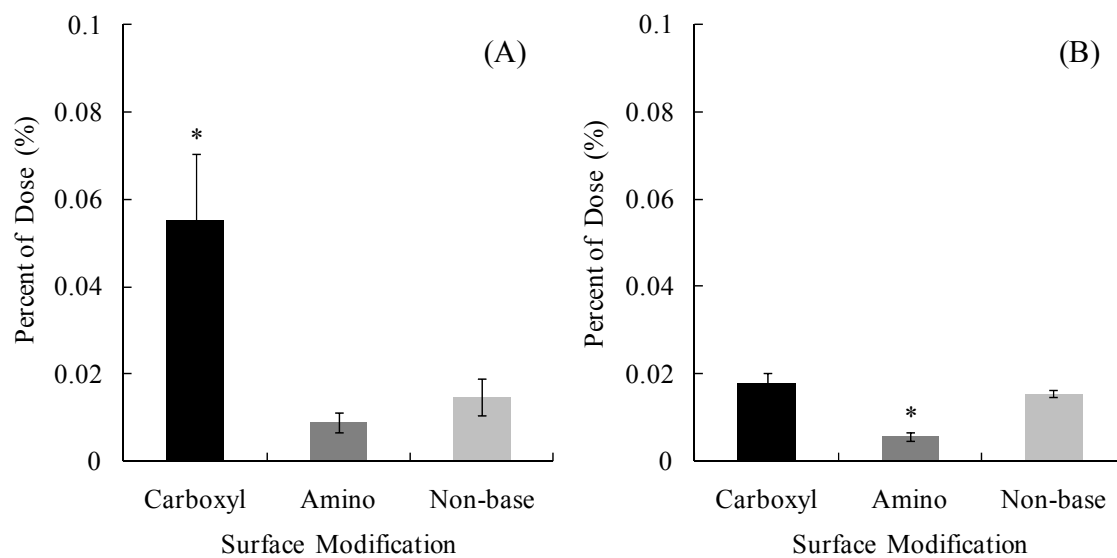


図 5-11 量子ドット (カルボキシル基修飾粒子, アミノ基修飾粒子, 表面修飾なしの粒子) を 3 時間曝露した PC12 細胞における細胞内に侵入した粒子および細胞膜に沈着した粒子の曝露量に対する百分率

(A) : PC12 細胞 10^6 個あたりに侵入した粒子の曝露量に対する百分率

(B) : PC12 細胞 10^6 個あたりに細胞膜に沈着した粒子の曝露量に対する百分率

* 表面修飾なしの量子ドット曝露群に対する t 検定結果 ($p < 0.05$)

粒子曝露群が 0.077% となった。1000 nm 粒子曝露群では 0.13% となり、100 nm 粒子曝露群は 1000 nm 粒子曝露群と比べて有意に小さくなった。

図 5-10 は量子ドットを 3 時間曝露した PC12 細胞における、細胞内に侵入した粒子数と細胞膜に沈着した粒子数である。細胞 1 個あたりに細胞内に侵入した粒子数は、カルボキシル基修飾粒子曝露群が多く 2.6×10^4 個となった。また、アミノ基修飾粒子曝露群では 4.3×10^3 個、表面修飾なしの粒子曝露群では 1.8×10^3 個となった。細胞膜に沈着した粒子数もカルボキシル基修飾粒子曝露群が多く、 8.6×10^3 個であった。アミノ基修飾粒子曝露群では 2.7×10^3 個、表面修飾なしの粒子曝露群では 1.9×10^3 個となった。

図 5-11 は、図 5-10 の縦軸を粒子の曝露量に対する百分率で表した図である。細胞 10^6 個あたりに細胞内に侵入した粒子の曝露量に対する百分率は、カルボキシル基修飾粒子曝露群が 0.055%、アミノ基修飾粒子曝露群が 0.0090%、表面修飾なしの粒子曝露群が 0.015% となり、カルボキシル基修飾粒子曝露群で有意に大きくなった。また、細胞膜に沈着した粒子の曝露量に対する百分率は、カルボキシル基修飾粒子曝露群が 0.018%、アミノ基修飾粒子曝露群が 0.0056%、表面修飾なしの粒子曝露群が 0.015% となり、アミノ基修飾粒子曝露群は表面修飾なしの粒子曝露群よりも有意に小さくなった。

5.3.3.3 蛍光ポリマー粒子および量子ドットの細胞毒性

図 5-12 は蛍光ポリマー粒子および量子ドットを曝露した PC12 細胞における曝露 24 時間後の生存率である。対照群と蛍光ポリマー粒子曝露群を比較すると、終濃度 0.1% と 1% の懸濁液では生存率はほとんど変わらなかった。一方、終濃度 10% の懸濁液では生存率が対照群よりも有意に減少した。また、粒径により生存率が異なり、22 nm 粒子曝露群では 0%、100 nm 粒子曝露群では 73%、1000 nm 粒子曝露群では 54% となった。対照群と量子ドット曝露群を比較すると、終濃度 0.01%、0.1%、1% の懸濁液では生存率の変化は見られなかった。

5.3.4 考察

^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の粒径は、懸濁直後よりも懸濁 1 時間後～24 時間後の方が小さくなった。これは溶媒の変化が粒子の分散性に影響を及ぼしたことが考えられる。ナノ粒子の懸濁液中の粒径は、懸濁する溶媒、粒子濃度、イオン強度、共存するタンパク質などにより影響を受け、凝集したり¹³、逆に凝集した粒子が解離したり¹⁴することが報告されている。 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子は第 2 章と同様の方法で調整した後、蒸留水中で保存した。蒸留水は大気中の二酸化炭素を吸収するため、懸濁液中の pH は弱酸性となる。一方、培養液の pH は 7～8 に調整されている。シリカの等電点は pH 2.3 であることから、蒸留水中、培養液中ともに粒子表面は負に帯電し、その電位の絶対値は培養液中の方が大きくなる。そのため、蒸留水中に懸濁させた ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子を培養液に添加したとき、粒子間の電的反発力が大きくなることが推測できる。その他、蒸留水と培養液では粘度やイオン

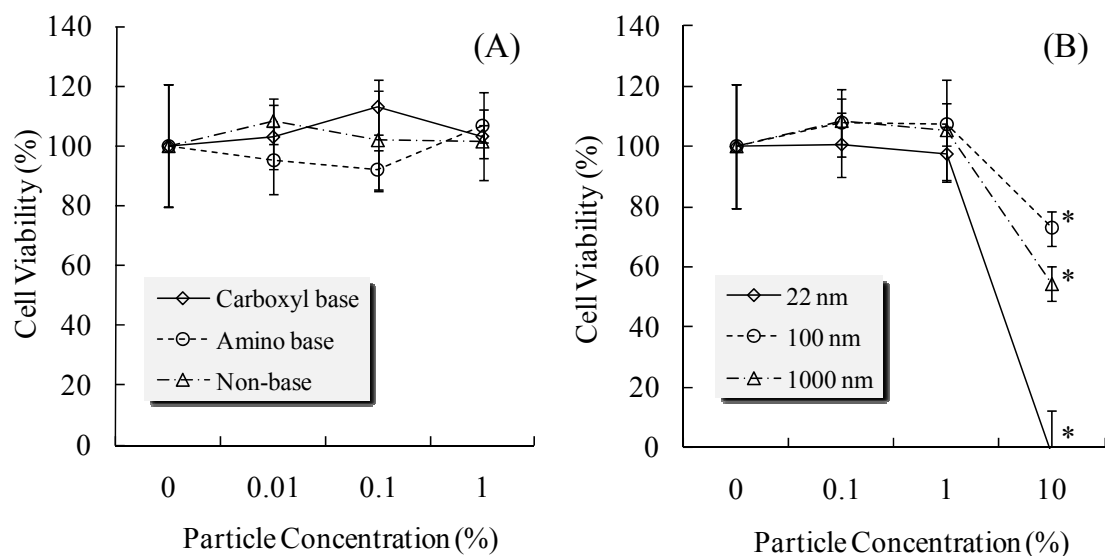


図 5-12 蛍光ポリマー粒子および量子ドットを 24 時間曝露した PC12 細胞における生存率
 (A) : カルボキシル基修飾粒子 (菱形), アミノ基修飾粒子 (丸), 表面修飾なしの粒子 (三角) の量子ドットを曝露した PC12 細胞の生存率
 (B) : 22 nm 粒子 (菱形), 100 nm 粒子 (丸), 1000 nm 粒子 (三角) の蛍光ポリマー粒子を曝露した PC12 細胞の生存率
 * 対照群に対する t 検定結果 ($p < 0.05$)

強度, タンパク質の有無などが異なる。これらのパラメーターの変化により, 培養液に懸濁させる前に凝集していた粒子が解離した可能性がある。

蛍光ポリマー粒子の懸濁直後のピーク粒径は, 3 種類ともに元の粒径より 5.6~90 nm 大きくなった。これは培養液中のタンパク質が粒子表面に吸着し, 吸着の分だけ粒径が大きくなったことが考えられる。動的光散乱法では, 粒子表面に吸着した物質も検出して粒径を算出する。Surらは, 銀ナノ粒子 (粒径 79 nm) を培養液に入れると, タンパク質の吸着により粒径が 26~32 nm 増加したことを報告している¹²。懸濁 3 時間後の粒径は, 1000 nm 粒子で顕著な粒径の増加が認められた。ナノ粒子は懸濁液中の粒子濃度やイオン強度などにより凝集する¹³。ストークスの定理を用いて, 培養液の粘度 (0.71 cP) から懸濁 3 時間後の粒子の沈降距離を算出すると, 22 nm 粒子は 2.4×10^{-4} mm, 100 nm 粒子は 5.0×10^{-3} mm, 1000 nm 粒子は 0.50 mm となる。したがって, 1000 nm 粒子が培養液の底部に最も速く蓄積し, それに伴う個数濃度の増加により凝集を引き起こしたと考えられる。22 nm 粒子で懸濁直後に検出された二次ピークは, 懸濁 3 時間後では検出されなかった。この理由として, 培養液中の ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の挙動と同様に, 溶媒の変化により懸濁前に凝集していた粒子が培養液中で解離した可能性が考えられる。

一方, 量子ドットの懸濁直後の粒径は, 3 種類とも元の粒径とほぼ同じであった。しかし, 懸濁 3 時間後の粒径は懸濁直後よりも 3~6 nm 程度大きくなった。これは蛍光ポリマー粒

子と同様に、培養液中のタンパク質が粒子表面に吸着し、吸着の分だけ粒径が大きくなったことが考えられる。

^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の細胞内侵入量の定量では、曝露 1 時間後に細胞内に侵入した粒子数が増加した。Rejmanらは、蛍光ナノ粒子（粒径 50 nm, 100 nm）が曝露 30 分後にはマウスメラノーマ細胞内に侵入したことを報告した⁹。したがって、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子も曝露直後から細胞内に侵入したと考えられる。曝露 8 時間後では、曝露 4 時間後と比べて急激に細胞内への侵入した粒子数と細胞膜に沈着した粒子数が増加した。これは細胞内に侵入した ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子がアポトーシスを誘発し、細胞膜の構造の変化により ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の細胞内への侵入が促進された可能性がある。アポトーシスの初期段階では、脂質二重膜の内側に存在するホスファチジルセリンが細胞膜の外側に露出するなど、細胞膜構造の変化が起こる。これにより、細胞膜と粒子の相互作用に影響を及ぼした可能性がある。Gopinathらは、銀ナノ粒子（粒径 10~15 nm）を曝露したハムスター腎臓由来細胞（BHK21）およびヒト結腸癌由来細胞（HT29）の細胞膜が、曝露 6 時間後にアポトーシスにより構造が変化したことを確認した¹⁵。 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子を曝露した細胞の沈殿物において、曝露 4 時間後以降に急激に沈着量が増加したことからも、細胞膜の構造の変化により細胞内に侵入した粒子数と細胞膜に沈着した粒子数が増加した可能性がある。

細胞 10⁶ 個あたりに侵入した ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子の曝露量に対する百分率を算出した結果、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子が最も多く侵入した曝露 8 時間後において、曝露量の 0.20% が侵入した。嗅神経は約 1000 万個存在すると報告されていることから¹⁶、PC12 細胞と嗅神経の粒子の侵入率が同じであると仮定すれば、鼻腔に侵入した ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子は最大で 2% が嗅神経内に侵入することになる。点鼻投与実験では、投与量の 0.050~3.6% が嗅球へ移行した。したがって、嗅球への移行率は PC12 細胞 10⁷ 個あたりの侵入率とほぼ一致する。この結果は、ナノ粒子が嗅神経を介して嗅球へ移行することを示唆している。

蛍光ポリマー粒子の細胞内侵入量の定量では、粒径によりその侵入量は大きく異なった。細胞内侵入量を粒子数で評価すると、より小さな粒子ほどよりたくさんの粒子が細胞内に侵入した。既存の研究でも、粒径が小さな粒子ほど細胞内に侵入した粒子数が増加したことが確認されている^{9,10}。また、細胞膜に沈着した粒子数も、粒径が小さくなるほど値が大きくなった。したがって、細胞内への侵入や細胞膜への沈着は粒径に依存して変化する可能性が高い。一方、曝露量に対する百分率で評価すると、細胞内に侵入した粒子の曝露量に対する百分率は 100 nm 粒子曝露群で最も大きくなった。22 nm 粒子曝露群と比較すると、粒子数では 22 nm 粒子曝露群の方が約 53 倍多かったが、曝露量に対する百分率では 100 nm 粒子曝露群の方が約 1.8 倍大きかった。このことから、100 nm 粒子の方が 22 nm 粒子よりも頻繁に細胞内へ取り込まれたと考えられる。したがって、細胞内に侵入した粒子数は粒径が小さくなるほど大きくなるが、細胞内へ取り込まれる頻度は粒径に必ずしも依存しない可能性がある。また、1000 nm 粒子曝露群では、粒子数および曝露量に対する百分率が 22 nm

粒子曝露群, 100 nm粒子曝露群と比べて有意に減少した。このことから, ナノ粒子とマイクロ粒子では, 粒径の違いが細胞内への侵入に大きく影響すると考えられる。

量子ドットの細胞内侵入量の定量では, カルボキシル基修飾粒子が細胞内に侵入した粒子数, 細胞膜に沈着した粒子数ともに最も大きくなった。曝露量に対する百分率も, カルボキシル基修飾粒子は表面修飾なしの粒子と比べて有意に増加した。一方, アミノ基修飾粒子では, 細胞内に侵入した粒子数が表面修飾なしの粒子と比べて有意に増加したが, 曝露量に対する百分率は有意に減少した。培養液中の粒度分布は 3 種類ともほぼ同じであったため, 表面修飾の違いにより細胞内侵入量が変化したと考えられる。Surらは, 表面修飾なしの銀ナノ粒子 (粒径 79 nm) と, グルコースあるいはラクトースを表面修飾させた銀ナノ粒子 (粒径 82~99 nm) をマウス線維芽細胞およびヒト肺癌細胞に曝露すると, 表面修飾した銀ナノ粒子の方が細胞内への侵入量が増加したことを報告した¹²。これらの結果から, ナノ粒子の細胞内への侵入には粒径と表面修飾が関与している可能性が高い。

蛍光ポリマー粒子の細胞毒性試験では, 終濃度 10%の懸濁液で 22 nm粒子曝露群の細胞が死滅した。一方, 100 nm粒子曝露群は曝露量に対して最も多く細胞内に侵入したにもかかわらず, 1000 nm粒子曝露群よりも生存率は高くなった。粒子の密度 (1.06 g/cm^3) から細胞 1 個あたりに侵入した粒子の重量を算出すると, 100 nm粒子は 22 nm粒子より約 1.8 倍大きくなる。一方, 細胞 1 個あたりに侵入した粒子の表面積を算出すると, 22 nm粒子は 100 nm粒子の約 2.6 倍大きくなる。したがって, 22 nm粒子曝露群の方が生存率が低下したことから, ナノ粒子の毒性は細胞内に存在する粒子の重量ではなく表面積が関与している可能性がある。Oberdorsterらの研究でも, ナノ粒子の毒性は表面積によると報告している¹⁷。また, 1000 nm粒子曝露群は 100 nm粒子曝露群よりも細胞内に侵入した粒子数が少なかったにもかかわらず, 生存率は 100 nm粒子曝露群よりも低くなった。これは, 1000 nm粒子がより速く培養ディッシュの底部に沈降して蓄積し, 底部に接着しているPC12 細胞と接触する確率が大きくなったことで, 生存率に影響を及ぼしたことが考えられる。細胞膜に沈着した粒子の曝露量に対する百分率が 1000 nm粒子曝露群で最も大きくなったことも, 細胞膜と相互作用し生存率を低下させた可能性を示唆している。

一方, 量子ドットの細胞毒性試験では, 生存率の低下は認められなかった。本実験では, 終濃度 1%が最大の濃度であったが, より高濃度で曝露すれば, 表面修飾の違いによる毒性の変化が現れることも考えられる。既存の研究でも, 表面修飾によるナノ粒子の毒性の変化が多数報告されている^{12,18,19}。また, 細胞 1 個あたりに侵入した粒子の表面積はカルボキシル基修飾粒子がアミノ基修飾粒子の約 6.1 倍, 表面修飾なしの粒子の約 15 倍大きくなったことから, 粒子の表面積が毒性と関連があるとすれば, カルボキシル基修飾粒子が最も毒性が高くなる可能性がある。これらの結果から, ナノ粒子は粒径や表面修飾, その他様々な物理化学的特性が複合的に関与し, 細胞毒性を引き起こしていることが示唆された。

5.4 結論

本章では、ナノ粒子の嗅神経を介した中枢神経系への移行を、 ^{14}C -ADP-SiO₂ ナノ粒子を点鼻投与した後の嗅球と脳に含まれる放射能の測定と、また蛍光ポリマー粒子および量子ドットを曝露した PC12 細胞における細胞内侵入量の測定により、定量的に捉えることを目的とした。点鼻投与した嗅球と脳におけるナノ粒子の移行量は、血流経路の移行量よりも大きかった。したがって、中枢神経系へのナノ粒子の移行経路は嗅神経を介した移行が血流経路よりも寄与していると考えられる。その移行量は、嗅球へは最大で投与量の 3.6%、脳へは最大で投与量の 2.2% であった。ナノ粒子が毒性を示した報告は多数存在することから、中枢神経系に到達したナノ粒子が神経疾患を引き起こす可能性は十分に考えられる。

PC12 細胞への侵入量の検討では、粒径と表面修飾によりその侵入量が異なった。このことから、鼻腔に侵入したナノ粒子の凝集状態、および粒子表面の組成により嗅神経に侵入する量が変化すると考えられる。また、PC12 細胞への侵入量は曝露時間とともに次第に増加した。したがって、鼻腔での滞留性も嗅神経への侵入に関与すると考えられる。

今後の課題として、ディーゼル排気粒子のように大気中に存在し、かつ人体に有害な物質を含むナノ粒子を用いた定量的評価が必要である。中枢神経系への移行量はナノ粒子の種類により異なると考えられる。我々が実際に曝露されうるナノ粒子が、中枢神経系へどの程度移行するかを解明することで、ナノ粒子の中枢神経系に対するリスク評価に大きく貢献できる。

参考文献

- 1) Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W. and Cox C. (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicology*. **16**: 437-445
- 2) Takenaka S., Karg E., Roth C., Schulz H., Ziesenis A., Heinzmann U., Schramel P. and Heyder J. (2001) Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environmental Health Perspectives*. **109**: 547-551
- 3) Semmler M., Seitz J., Erbe F., Mayer P., Heyder J., Oberdörster, G. and Kreyling W. G. (2004) Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhalation Toxicology* **16**: 453-459
- 4) De Lorenzo, A. J. (1970) The olfactory neuron and the blood-brain barrier. *Taste and Smell in Vertebrates*. London, Churchill: 151-176
- 5) Gross W. G. and Beidler L. M. (1973) Fast Axonal Transport in C-fiber of Garfish Olfactory Nerve. *Journal of neurobiology*. **4**: 413-428

-
- 6) Ochs S., Sabri M. I. and Johnson J. (1969) Fast Transport System of Materials in Mammalian Nerve Fibers. *Science* **163**: 686-687
 - 7) Gross W. G. and Kreutzberg W. G. (1978) Rapid axoplasmic transport in the olfactory nerve of the pike: I. Basic transport parameters for proteins and amino acids. *Brain research*. **139**: 65-76
 - 8) Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schurch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Hof V. I., Heyder J. and Gehr P. (2005) Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental Health Perspectives*. **113**: 1555-1560
 - 9) Rejman J., Oberle V., Zuhorn I. S. and Hoekstra D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*. **377**: 159-169
 - 10) VanWinkle B. A., De Mesy Bentley K. L., Malecki J. M., Gunter K. K., Evans I. M., Elder A., Finkelstein J. N., Oberdorster G. and Gunter T. E. (2009) Nanoparticle (NP) uptake by type I alveolar epithelial cells and their oxidant stress response. *Nanotoxicology*. **3**: 307-318
 - 11) Elechiguerra J. L., Burt J. L., Morones J. R., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H. H. and Yacaman M. J. (2005) Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*. **3**: 1-10
 - 12) Sur I., Cam D., Kahraman M., Baysal A. and Culha M. (2010) Interaction of multi-functional silver nanoparticles with living cells. *Nanotechnology*. **21**: 1-10
 - 13) Kittler S., Greulich C., Gebauer J. S., Diendorf J., Treul L., Ruiz L., Gonzales-Calbet J. M., Vallet-Regi M., Zellner R., Koller M. and Epple M. (2010) The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*. **20**: 512-518
 - 14) Fabrega J., Fawcett S. R., Renshaw J. C. and Lead J. R. (2009) Silver Nanoparticle Impact on Bacterial Growth: Effect of pH, Concentration, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology*. **43**: 7285-7290
 - 15) Gopinath P., Gogoi S. K., Chattopadhyay A. and Ghosh S. S. (2008) Implications of silver nanoparticle induced cell apoptosis for in vitro gene therapy. *Nanotechnology*. **19**: 1-10
 - 16) Byrd C. A. and Burd G. D. (1991) Development of the olfactory bulb in the clawed frog, *Xenopus laevis*: A morphological and quantitative analysis. *The Journal of Comparative Neurology*. **314**: 79-90
 - 17) Oberdorster G., Finkelstein J. N., Johnston C., Gelein R., Cox C., Baggs R. and Elder A. C. P. (2000) Acute Pulmonary Effects of Ultrafine Particles in Rats and Mice. *Health Effects Institute, HEALTH EFFECTS INSTITUTE*. **96**: 1-86

-
- 18) Panacek A., Kolar M., Vecerova R., Pucek R., Soukupova J., Krystof V., Hamal P., Zboril R. and Kvitek L. (2009) Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*. **30**: 6333-6340
- 19) Kvitek L., Vanickova M., Panacek A., Soukupova J., Dittrich M., Valentova E., Pucek R., Bancirova M., Mulde D. and Zboril R. (2009) Initial Study on the Toxicity of Silver Nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *Journal of Physical Chemistry C*. **113**: 4296-4300

第6章 結 論

本研究では、嗅神経を介したナノ粒子（粒径1～100 nm）の中樞神経系への移行に着目した。既存の研究では、ナノ粒子曝露により中樞神経系でナノ粒子が増加することが確認されている。その移行経路として、嗅神経を介した移行経路が示唆されているが、実際にその経路に沿って移行することを確認した報告はない。血流を介した移行経路では、血管と脳の間には血液脳関門が存在するため、ナノ粒子が脳の組織内に侵入するにはこの関門を通過しなければならない。しかし、嗅神経を介して移行した場合、二次ニューロンの軸索終末は直接脳内に投射しているため、軸索輸送により脳の組織内へ到達する可能性がある。ナノ粒子が嗅神経を介して中樞神経系へ移行することが明らかになれば、アルツハイマー病などの神経疾患との関連性が懸念される。すなわち、この移行経路の存在を解明することは、中樞神経系に対するナノ粒子のリスク評価を行う上で非常に大きな意味を持つ。

本研究では、（1）ナノ粒子の嗅神経を介した移行経路が実際に存在するか、（2）鼻腔内に侵入したナノ粒子が嗅神経を介してどの程度移行するかの二点を解明することを目的とした。（1）に関しては、顕微鏡を用いたイメージング解析により、嗅粘膜および嗅球に侵入したナノ粒子を観察した。（2）に関しては、ICP-MSや液体シンチレーションカウンターを用いて、嗅球や脳へのナノ粒子の移行を定量的に検討した。

第2章では、ナノ粒子の血流を介した中樞神経系への移行を検討した。ナノテク製品に幅広く使用される二酸化チタンナノ粒子と放射性シリカ粒子を用いて、ナノ粒子が気管内に侵入した場合と血管内に侵入した場合の体内動態を検討した。二酸化チタンナノ粒子（粒径5 nm, 55 nm）を気管内投与したラットにおける血液中および臓器中のチタン重量濃度を定量した結果、肺ではチタン重量濃度が有意に増加したものの、血液中では増加が認められなかった。臓器中では、55 nm 粒子曝露群の肝臓中および腎臓中でチタン重量濃度の増加が認められたものの、5 nm 粒子曝露群ではどの臓器もチタン重量濃度の増加は認められなかった。そこで、走査型電子顕微鏡を用いて懸濁液中の二酸化チタンナノ粒子を観察したところ、懸濁液中で粒径が数 μm ～10 μm の凝集体が観察された。このことから、二酸化チタンナノ粒子は気管内投与を行う前に既に凝集し、気管内に投与された二酸化チタンナノ粒子の凝集体は血液空気関門を通過できずに肺内で滞留したと考えられた。この結果は、ミクロンオーダーまで凝集したナノ粒子が血管内に侵入せず、そのまま肺内で滞留することを示唆している。したがって、気道から肺胞に到達した時点でのナノ粒子の粒径が、組織内への侵入に関わる重要なパラメーターとなっていることが示唆された。

放射性シリカ粒子の体内動態実験では、粒径が11 nmおよび130 nmの放射性シリカ粒子をマウスの尾静脈に投与し、血管内に侵入した放射性シリカ粒子の体内動態を検討した。血中に投与された放射性シリカ粒子は、最大で投与量の0.03%が嗅球で、投与量の0.16%が脳で確認された。また、粒径の違いによる移行率の差は認められなかった。この結果から、

血中経路では脳や嗅球へほとんど移行しないことが明らかとなり、既存の研究で示された中枢神経系へのナノ粒子の移行は、嗅神経経路を含む他の経路が関与していることを確認することができた。

第3章では、ナノ粒子が嗅神経経路で中枢神経系へ移行する可能性を検証するため、共焦点レーザー顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いたナノ粒子曝露後の嗅神経の観察を行った。蛍光ポリスチレンナノ粒子（粒径 40 nm）の点鼻投与実験では、鼻腔に投与した蛍光ポリスチレンナノ粒子が嗅粘膜に沈着，侵入することを確認した。嗅粘膜に侵入した蛍光ポリスチレンナノ粒子のほとんどは嗅上皮に滞留したが，一部は基底膜を通過し，粘膜固有層で確認された。この結果から，嗅神経に侵入したナノ粒子が軸索輸送により嗅球へと移行する可能性があることを，細胞層単位で実証した。

次に，ナノ粒子が実際に嗅神経に侵入し，嗅球へ移行することを嗅神経1本単位で確認するため，金コロイド（粒径15 nm）の点鼻投与実験を行った。透過型電子顕微鏡を用いて嗅球の糸球体層を観察した結果，嗅神経の軸索終末とそれを取り囲む糸球体周辺細胞で，金コロイドが確認された。この結果から，嗅神経に侵入したナノ粒子が軸索終末まで到達し，さらにはシナプスを越えて糸球体周辺細胞へ侵入することが明らかとなった。僧帽細胞／房飾細胞の樹状突起では金コロイドが確認されなかったため，二次ニューロンへの金コロイドの侵入は認められなかったものの，本成果よりナノ粒子の嗅神経を介した移行経路が存在することが実証され，鼻腔に侵入したナノ粒子が嗅球へ到達することを解明した。

第4章では，大気中に広く存在するディーゼル排気粒子（DEP）をマウスに曝露し，大型放射光施設の蛍光 X 線分析を用いて嗅神経のイメージングを行った。炭素を核とする DEP には，様々な元素が付着している。その中には，人体に有害な元素も含まれている。DEP が嗅神経を介して中枢神経系へ移行すれば，これらの毒性の高い元素の蓄積により神経疾患を引き起こす可能性がある。この付着元素を確認するため，はじめに DEP の組成分析を行った。その結果，エンジンオイルに含まれている Na, Ca, Ti, Ni, Zn が DEP で検出された。この結果から，ディーゼルエンジン稼働により，エンジンオイル中の金属化合物や金属イオンが排気ガスと一緒に排出され，その一部は DEP に付着することが示唆された。

次に，これらの付着元素が DEP とともに中枢神経系へと移行するかを検討するため，大型放射光施設での蛍光 X 線分析を行った。DEP（粒径 40 nm）を吸入曝露もしくは DEP 懸濁液を点鼻投与し，マウスの嗅粘膜，嗅球における元素マッピングと，DEP に多く付着している Zn の XAFS 分析を行った。DEP の吸入曝露実験では，曝露群の嗅上皮や嗅神経束において，Fe, Cu, Zn, Br の増加が見られた。また，DEP 懸濁液の点鼻投与実験でも，曝露群の嗅粘膜で Ca, Mn, Ni, Fe, Cu, Zn が増加した。したがって，DEP が嗅神経内に侵入し，一部は細胞体で蓄積し，一部は軸索輸送により嗅球へ移動したと考えられる。さらに，DEP 懸濁液を点鼻投与したマウスの嗅球から，嗅神経層や糸球体層で Ca, Cu, Ni, Zn の局在が確認された。この部位における Zn の XAFS 分析を行った結果，DEP 懸濁液から得られた Zn の XAFS スペクトルと吸収端エネルギーがほぼ一致した。また，この部位の Zn の

化学結合状態は、DEP懸濁液に含まれるZnの化学結合状態と類似した。これらの結果から、DEPが嗅神経経路により嗅球の糸球体層まで到達した可能性が高い。実際に大気中から曝露されうるナノ粒子が嗅球で確認されたことにより、ナノ粒子が中枢神経系へ悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

第5章では、鼻腔内に侵入したナノ粒子が中枢神経系へどの程度移行するかを、マウスおよびPC12細胞を用いて定量的に検討した。はじめに、放射性シリカナノ粒子(粒径37 nm)をマウスに点鼻投与し、嗅球と脳に移行した放射性シリカナノ粒子を定量した。その結果、最大で投与量の3.6%が嗅球で、投与量の2.2%が脳で確認された。一方、第2章で検討した放射性シリカ粒子(粒径11 nm, 130 nm)の血流経路での移行率は、嗅球では最大で投与量の0.03%、脳では0.16%であったため、嗅神経経路の方が移行率が大きくなった。したがって、中枢神経系へのナノ粒子の移行は血流経路よりも嗅神経経路の方が寄与が大きいことが明らかとなった。この結果は、嗅神経経路がナノ粒子の吸入曝露に起因する健康影響に結びつく主要な移行経路となりうることを示唆している。

次に、粒径の異なる蛍光ポリマーナノ粒子および表面修飾の異なる量子ドットをPC12細胞へ曝露し、粒径や表面修飾の違いが神経細胞内への侵入量に影響を及ぼすかを検討した。粒径の異なる蛍光ポリマー粒子(粒径22 nm, 100 nm, 1000 nm)を曝露した結果、粒径の小さい粒子ほど細胞内に侵入した粒子数が増加した。また、表面修飾の異なる量子ドット(カルボキシル基修飾粒子、アミノ基修飾粒子、表面修飾なしの粒子)を曝露した結果、カルボキシル基修飾粒子が最も細胞内に侵入した。このことから、鼻腔に侵入した粒子の粒径、および粒子表面の組成が、ナノ粒子の嗅神経への侵入に関与していることが示唆された。さらに、放射性シリカナノ粒子(粒径58 nm)をPC12細胞に曝露し、継時的な細胞内侵入量の変化を検討した。その結果、細胞内への侵入量は曝露からの経過時間とともに増加した。したがって、ナノ粒子の鼻腔内での滞留性も嗅神経への侵入に関与すると考えられる。また、細胞内に侵入した放射性シリカナノ粒子の投与量に対する百分率は、細胞 10^6 個当たり最大で投与量の0.2%であった。嗅神経は鼻腔内に約 10^7 本存在することから、鼻腔内に侵入したナノ粒子の嗅神経内への侵入率は約2%と推算できる。この値は、本章の放射性シリカナノ粒子(粒径37 nm)点鼻投与実験で得られた嗅球への移行率0.05~3.6%の範囲にあてはまる。このことから、鼻腔内に侵入したナノ粒子の内、数%は嗅神経内に侵入して嗅球や脳まで到達することが示唆された。

本研究より、ナノ粒子の嗅神経を介した移行経路の存在が確認され、その移行量は血流経路よりも大きく、中枢神経系に悪影響を与える可能性があることを解明した。ナノテクノロジーは依然発展を続けており、ナノテク製品をはじめとして我々が日常的にナノ粒子に触れる機会は次第に増加している。これらの製品からナノ粒子が飛散し、鼻腔内に侵入すれば、嗅神経を介して中枢神経系へ到達することが懸念される。今後、ナノ粒子の中枢神経系への影響を解明する上で、本研究の成果はそのリスク評価に大きく貢献できるものである。

謝 辞

本研究では、数多くの先生方にご指導を賜り、数多くの学生方とともに切磋琢磨しながら研究を進めました。ここに感謝の意を表します。

はじめに、著者が所属いたしました二つの研究室の先生方や学生方に、多大なご指導とサポートをいただきました。ここに感謝の意を表します。

著者が博士一回生まで所属いたしました京都大学工学研究科環境衛生学講座研究室では、内山巖雄先生、松井利仁先生、村山留美子先生より懇切丁寧なご指導と貴重な助言を賜りました。また、当研究室所属の学生方と共に実験を行い、適切な助言と温かいサポートをいただきました。深く感謝申し上げます。

博士二回生から二年間所属いたしました京都大学工学研究科環境リスク管理工学分野研究室では、米田稔先生、中山亜紀先生、松井康人先生より懇切丁寧なご指導と貴重な助言を賜り、共同で実験をさせていただきました。また、当研究室所属の学生方と共に実験を行い、いつも温かいサポートをいただきました。深く感謝申し上げます。

また、本論文の作成にあたり、京都大学工学研究科環境質管理分野研究室の清水芳久先生と松田知成先生より、懇切丁寧なご指導と貴重な助言を賜りました。深く感謝申し上げます。

次に、本研究では様々な大学、研究機関、企業の方々と共同で研究を遂行いたしました。ここに感謝の意を表します。

二酸化チタンナノ粒子の体内動態実験では、国立環境研究所の藤巻秀和先生、山元昭二先生、岩手医科大学の世良耕一郎先生、日本アイソトープ協会滝沢研究所の伊藤じゅん先生、九州大学の田中昭代先生にご指導を賜り、実験施設の使用および共同で実験をさせていただきました。深く感謝申し上げます。

放射性シリカ粒子を用いた体内動態実験および細胞実験では、京都大学の森澤眞輔先生、産業技術総合研究所の岸本充生先生に多大なご指導を賜りました。徳島大学の三好弘一先生には、徳島大学アイソトープ総合センターにて共同で実験をさせていただき、多大なご指導を賜りました。京都大学の杉本実紀先生には、放射性同位元素センターにて共同で実験をさせていただき、多大なご指導を賜りました。また、放射性同位元素センターの宮武秀男様、石塚史彦様、高島圭伊子様には当センターを使用する際に大変お世話になりました。深く感謝申し上げます。

蛍光ポリスチレンナノ粒子のイメージング実験および金コロイドのイメージング実験では、京都府立医科大学の河田光博先生、西真弓先生、松田賢一先生、坂本浩隆先生に多大のご指導と実験施設の使用、および共同で実験をさせていただきました。深く感謝申し上げます。また、京都大学の磯田正二先生、倉田博基先生には透過型電子顕微鏡を用いた試料の観察をさせていただきました。さらに、ハーバード大学の津田陽先生にはこれらの実

験における貴重な助言を賜りました。深く感謝申し上げます。

ディーゼル排気粒子のイメージング実験では, SPring-8・BL37XU 担当者の寺田靖子先生, 東京都神経科学総合研究所の市川眞澄先生, 京都大学の高岡昌輝先生, 塩田憲司技官に多大なご指導を賜り, 実験施設の使用および共同で実験をさせていただきました。また, (株) 島津製作所の奥田大二氏, 木本成氏, その他多数の社員の方々に多大なサポートをいただき, 度々御社の実験装置を使用させていただくとともに, 共同で実験をさせていただきました。深く感謝申し上げます。

その他, 本研究を遂行するに当たり, 多大な方々から懇切丁寧なご指導, 貴重な助言, 温かなサポートを賜りました。ここに深く感謝申し上げます。

最後に, いつも温かく見守ってくれた両親と, 毎日私を支えてくれた妻の美香に感謝の意を表します。本当にありがとうございました。

2011 年 2 月

坂井 伸光